

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**A sinalização por Ácido Jasmónico e a resistência a
fungos biotróficos em videira**

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Ana Catarina Guerreiro Marques

Dissertação orientada por:

Doutora Andreia Figueiredo (BioISI-FCUL)

Doutora Marta Sousa Silva (CQB-FCUL)

2015

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**A sinalização por Ácido Jasmónico e a resistência a
fungos biotróficos em videira**

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Ana Catarina Guerreiro Marques

Dissertação orientada por:

Doutora Andreia Figueiredo (BiolSI-FCUL)

Doutora Marta Sousa Silva (CQB-FCUL)

2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Doutora Andreia Figueiredo e Doutora Marta Sousa Silva por me terem aceite neste projeto de mestrado.

Um grande obrigado, à Doutora Andreia Figueiredo, por toda a paciência e dedicação que teve comigo ao longo desta aprendizagem. Pela motivação constante, compreensão e pelas chamadas de atenção. Acho que não podia ter tido melhor orientação ao longo deste ano de trabalho.

Queria agradecer ao grupo de investigação de *Plant Functional Genomics Group - Biosystems and Integrative Sciences Institute* (BioISI), nomeadamente, Doutora Mónica Sebastiana e Doutora Filipa Monteiro por toda ajuda prestada.

Gratificar a simpatia, dedicação e constante disponibilidade da professora Doutora Anabela Bernardes e a preciosa ajuda da professora Doutora Rita Matos.

Um especial obrigado à Dona Manuela Lucas, pelos conselhos sábios, pela amizade e pelo carinho nos momentos mais difíceis para mim.

Sem esquecer a Inês Diniz, aluna de doutoramento do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro pelos seus conselhos e pelas nossas conversas e a Marisa Maia pela ajuda e amizade.

Gostaria por fim, de agradecer aos meus pais e irmã pelo apoio incondicional, pela confiança e pelo carinho.

Resumo

A doença do míldio na videira é causada pelo fungo oomycete biotrófico obrigatório *Plasmopara viticola*. A espécie *Vitis vinifera* é altamente suscetível ao *P. viticola*, desta forma, para manter a produtividade e qualidade das uvas e dos produtos processados, os agricultores recorrem a quantidades massivas de produtos fitofarmacêuticos incrementando os custos de produção e o impacto ambiental. O aparecimento de isolados fúngicos resistentes aos fungicidas requer o desenvolvimento de métodos alternativos para o controlo da doença. Para isso é da maior importância a caracterização dos mecanismos que levam à ativação da resposta de defesa da videira e ao estabelecimento de uma interação incompatível.

Recentemente, uma análise combinada de transcritômica e metabolômica sugeriu o envolvimento do ácido jasmónico (JA) na resistência ao *P. viticola*. Uma análise da expressão de genes relacionados com a síntese e sinalização por JA revelou diferenças entre cultivares suscetíveis e resistentes, levando à hipótese de que o JA participa no estabelecimento ou na manutenção da resistência da *V. vinifera* variedade 'Regent' ao fungo *P. viticola*.

O presente trabalho teve como objetivo comprovar a hipótese de que o JA está envolvido na resistência da videira contra *P. viticola*. Numa primeira abordagem comparou-se dois genótipos de videira, resistente e suscetível ao *P. viticola* quanto ao estabelecimento da sinalização e síntese dos precursores do JA. Posteriormente, foi avaliada a regulação da via de sinalização por JA, foi feita a quantificação de algumas fitohormonas (JA, metil Jasmonato (MeJA), molécula bioativa do JA ligado à isoleucina (JA-Ile) e ácido salicílico (SA)) e foi iniciado o estudo da relação entre a via do SA e JA no genótipo resistente.

Os nossos resultados demonstram que no genótipo resistente a sinalização é iniciada mais cedo do que no genótipo suscetível (aumento da concentração de radicais livres de oxigénio e da peroxidação dos lípidos). Esta sinalização é acompanhada pela síntese dos precursores do JA, nomeadamente o ácido α -linolénico (C18:3). No genótipo resistente houve um aumento significativo dos níveis de JA-Ile às 12 horas após inoculação (hpi) e nas primeiras horas de interação verificou-se uma sinergia entre as vias do JA e do SA. Estes resultados suportam a hipótese que o JA pode ser responsável por estabelecer ou manter a resistência da cultivar 'Regent' contra *P. viticola*. A participação do JA na resistência contra este fungo biotrófico pode ser importante para o delineamento de novas estratégias para o controlo desta doença.

Palavras - Chave: *Plasmopara viticola*, Resistência, Ácido jasmónico, ROS, Ácidos gordos (C18:3)

Abstract

The Downy mildew in grapevine is caused by obligate biotrophic oomycete, *Plasmopara viticola*. The domesticated *Vitis vinifera* is highly susceptible to *P. viticola*. To maintain productivity and quality of grapes and processed products, the farmers use massive quantities of expensive pesticides causing several environmental problems. The use of these chemicals and the appearance of fungicide resistant fungal isolates reflect the need to develop alternative methods for disease control. Hence, it is important to characterize the mechanisms that lead to the activation of the defense response in grapevine and establishment of an incompatible interaction.

Recently, the combination between transcriptome and metabolome analysis suggested the role of jasmonic acid (JA) in the establishment of resistance against *P. viticola*. A gene expression analysis related with JA synthesis and signaling revealed differences between susceptible and resistant cultivars leading to the hypothesis that JA participates in establishing or maintaining the resistance against *P. viticola* in resistant grapevine genotypes.

This study aimed to demonstrate the participation of JA in the resistance against the obligate biotrophic fungus, *P. viticola*. In a first approach we compared two grapevine genotypes, resistant and susceptible to *P. viticola* regarding the establishment of signaling and synthesis of JA precursors. Subsequently, we evaluated the regulation of JA signaling pathway, performed a quantification of several phytohormones (JA, methyl jasmonate (MeJA), bioactive molecule of JA conjugated with isoleucine (JA-Ile) and salicylic acid (SA)) and initiated the study of the initial cross talk between SA and JA pathway in the resistant genotype.

Our results demonstrated that, in the resistant grapevine genotype (*V. vinifera* cv 'Regent') signaling is initiated earlier than in the susceptible genotype (with increased concentration of oxygen free radicals and lipid peroxidation). This signaling is accompanied by synthesis of JA precursors namely the α -linolenic acid (C18:3). In the resistant genotype there was a significant increase in JA-Ile levels 12 hours post inoculation (hpi). In the first hours of interaction, a collaboration between JA and SA signalling pathways seems to occur. Our results support the hypothesis that JA may be responsible for establishing or maintaining the 'Regent's' resistance against *P. viticola*. The participation of JA in the resistance against this biotrophic fungus can be important for delineating new strategies for the control of this disease.

Keyword: *Plasmopara viticola*, Resistance, Jasmonic acid, ROS, Fatty acids (C18:3)

Símbolos e Abreviaturas

ABTS – 2, 2'-azine – bis – (3 –ethylbenzothiazoline – 6 – sulphonic acid)

AOC – Allene oxide cyclase

AOS – Allene oxide synthase

APX – Ascobarto peroxidase

AsA - Ascorbato

AtMYB44 – MYB domain protein 44

Avr – Gene avirulento

C16:0 – Ácido palmítico

C16:1 - Ácido palmitoleico

C18:0 – Ácido esteárico

C18:1 – Ácido oleico

C18:2 – Ácido linoleico

C18:3 – Ácido α -linolénico

CAT – Catalase

cDNA - DNA complementar

COI1- *Coronatine insensitive 1*

DBI – Índice de duplas ligações

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EF1 α – *Elongation factor 1 α gene*

ET – Etileno

ETI – Imunidade desenacadeada por efetores

FAs – Ácidos gordos

GADPH – *Glyceraldehyde – 3- phosphate dehydrogenase gene*

GC – Cromatografia gasosa

GPX – Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione

H₂O - água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

Hpi – Horas após inoculação

13- HPOT – *13S-hydroperoxy (9Z,11E,15 Z) octadecatrienoic acid*

HR – Resposta de hipersensibilidade

JA – Ácido jasmónico

JA-Ile – Ácido jasmónico ligado à isoleucina
 JAR1 – *Jasmonate - amido synthetase*
 JAZ – *Jasmonate ZIM domain protein*
 JAZ 1 – *Jasmonate ZIM domain protein 1*
 JAZ 3 – *Jasmonate ZIM domain protein 3*
 13 -LOX – 13 - Lipoxigenase
 MDA – Dialdeído malónico
 MeJA – Metil jasmonato
 MYC2 – *Basic helix-loop-helix Leu zipper transcription factor*
 NINJA – *Novel interaction of JAZ/TIFY*
 NPR1- *Nonexpresser genes PR1*
 $^1\text{O}_2$ - Oxigênio singleto
 $\text{O}_2^{\bullet-}$ - Ânion superóxido
 OH^\bullet - Radical hidroxilo
 OPDA – *Cis – (+) – 12- oxo-phytodienoic*
 OPR3 – *Oxophytodienoate reductase 3*
 PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos
 PLA1 – Fosfolipase A1
PR- pathogenesis related gene
PR1- pathogenesis related gene 1
PR2- pathogenesis related gene 2
PR5- pathogenesis related gene 5
PR10- pathogenesis related gene 10
 PrxR- Peroxiredoxina
 PTI- Imunidade desencadeada por PAMPS
 qPCR- PCR em tempo real
 R- Gene de resistência
 RNA - Ácido ribonucleico
 RNAt- RNA Total
 ROS – Espécies reativas de oxigênio
 S - declive da curva padrão
 SA - Ácido salicílico
 SAR - Resistência sistêmica adquirida
 SCF – *SKP-cullin-F-box protein complex*
 SOD – Superóxido dismutase

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – Método substâncias reativas e tiobarbitúrico

TPL – *TOPLESS*

TPRs - Proteínas relacionadas com *TOPLESS*

Trolox – *6-hydroxy -2, 5, 7, 8 – tetramethylchroman – 2- carboxylic acid*

UBQ – *Poly-ubiquitin gene*

WRKY70 – *WRKY DNA binding protein 70*

Unidades

g – unidade de medida da força centrífuga relativa (RCF)

mg – miligrama

ml – mililitros

mM – milimolar

nm – nanómetros

s - segundos

Ta – Temperatura de annealing (°C)

Tm – Temperatura de melting (°C)

µg - micrograma

µl –microlitros

µM - micromolar

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
<i>Abstract</i>	v
Símbolos e Abreviaturas	vi
1. Introdução	1
1.1 Mecanismos de defesa das plantas	2
1.1.1 Resposta de Hipersensibilidade (HR)	2
1.1.2 Espécies reativas de oxigénio (ROS)	3
1.1.3 Ácidos Gordos (FAs) nas membranas celulares	4
1.1.4 Fitohormonas	4
1.2 Ácido jasmónico (JA)	5
1.2.1 Biossíntese do JA	5
1.2.2 Sinalização associada ao JA	7
2. Objetivos	7
3. Materiais e Métodos	8
3.1 Material vegetal	8
3.2 Inoculação de <i>V. vinifera</i> com <i>P. viticola</i>	8
3.3 Produção de ROS e capacidade antioxidante	9
3.3.1 Extração de proteínas	9
3.3.2 Quantificação de proteínas	9
3.3.3 Produção de ROS – Determinação da concentração de H ₂ O ₂	9
3.3.4 Determinação da capacidade antioxidante total	9
3.4 Peroxidação dos lípidos	10
3.5 Quantificação dos ácidos gordos totais	10
3.6 Extração de RNA	10
3.7 Síntese de cDNA	11
3.8 Electroforese de Gel em Agarose	11
3.9 Seleção de genes para o qPCR e desenho de <i>primers</i>	11

3.10 qPCR	12
3.11 Quantificação das fitohormonas	12
3.12 Análise estatística	12
4. Resultados e Discussão	13
4.1 Indução de ROS	13
4.2 Peroxidação dos lípidos	14
4.3 Capacidade Antioxidante	15
4.4 Determinação da composição de FAs nas membranas celulares	16
4.5 Identificação do perfil de expressão de genes envolvidos na sinalização por JA	20
4.6 Quantificação dos níveis endógenos de OPDA, JA, JA-Ile e SA	25
5. Conclusão	27
6. Referências Bibliográficas	29
7. Anexos	
Anexo I – Sequência de <i>primers</i> dos genes alvos e dos genes de referência	36
Anexo II – Composição dos FAs nas membranas celulares	37
Anexo III – Quantificação de fitohormonas (OPDA, JA, JA-Ile e SA) na cultivar 'Regent'	38
Anexo IV – Curvas de dissociação dos genes estudados	38

1. Introdução

A *Vitis vinifera* é a espécie de videira mais importante cultivada em todo o mundo e com maior impacto económico. A indústria vitivinícola é extremamente importante para a economia Portuguesa, representando mais de 680 milhões de euros anuais em exportações (Global Agricultural Information network, 2013). O oomycete *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et de Toni é um fungo biotrófico obrigatório que causa a doença do míldio da videira, foi introduzido na Europa no século XIX (Millardet, 1881) e rapidamente se espalhou para todas as principais regiões produtoras de uva do mundo (Galet, 1977), tornando-se numa das doenças mais destrutivas da videira. Desde então, tem causado perdas enormes na produtividade, especialmente em regiões de elevada humidade e com temperaturas amenas (revisto em Gessler et al. 2011). A espécie *V. vinifera* é altamente suscetível ao *P. viticola*, embora varias espécies *Vitis* americanas e asiáticas apresentem diferentes níveis de resistência ao *P. viticola* (Polesani et al. 2010; Gessler et al. 2011). Na Europa, a estratégia atual de controlo da doença consiste na utilização massiva de produtos fitofarmacêuticos altamente dispendiosos, em cada estação, de forma a garantir uma boa colheita (Gessler et al. 2011). Uma outra abordagem tem sido o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, de forma a desenvolver castas mais resistentes, através da introdução de características associadas à resistência por cruzamento com espécies *Vitis* americanas (Gessler et al. 2011). No entanto, o *P. viticola* apresenta um potencial evolutivo elevado sendo capaz de desenvolver resistência a fungicidas (Chen et al. 2007, Blum et al. 2010) e quebrar os mecanismos de resistência das plantas (Peressotti et al. 2010, Casagrande et al. 2011, Delmotte et al. 2013). Desta forma torna-se extremamente importante uma melhor compreensão deste patossistema e a caracterização dos mecanismos que levam à ativação da resposta de defesa da videira.

Vários estudos têm relatado que a resistência ao míldio é baseada em processos pós - infecção compreendendo barreiras físicas e químicas e ativação de mecanismos de defesa (Navajas et al. 2008; Polesani et al. 2010). Estudos de transcritómica (Hamiduzzaman et al. 2005; Kortekamp, 2006; Trouvelot et al. 2008; Polesani et al. 2010; Figueiredo et al. 2012) e proteómica (Milli et al. 2012) indicam a presença de uma fraca e insuficiente resposta de defesa nas videiras suscetíveis. Estudos recentes apontam que a diferença entre a resistência e a suscetibilidade, não se baseia na presença ou ausência de fatores genéticos específicos, mas reflete diferenças de amplitude e cinética da indução de genes na defesa contra este patógeno (Polesani et al. 2010; Figueiredo et al. 2012). Apesar dos vários estudos realizados

para entender mecanismos que levam à ativação da resposta de defesa da videira, é necessário desenvolver novas abordagens analíticas e uma maior colaboração entre biólogos, químicos e engenheiros agrônomos para alargar o nosso conhecimento das interações entre o *P. viticola* e a videira e descobrir novos elementos reguladores das respostas das plantas (Kortekamp et al. 2008; Santino et al. 2013).

1.1 Mecanismos de defesa das plantas

As plantas são organismos sésseis que estão constantemente a ser expostas a stresses abióticos (condições ambientais, temperatura, água, salinidade) e bióticos (exposição de agentes patogénicos). Porém, elas conseguem sobreviver devido à sua capacidade de adaptar respostas de defesa (Balbi and Devoto, 2007; Antico et al. 2012; Ali et al. 2012).

Alguns mecanismos de defesa das plantas são pré-existent, como as barreiras físicas e químicas que impedem a entrada dos patógenos. Enquanto outros mecanismos são só induzidos mediante a invasão e reconhecimento dos agentes patogénicos. As plantas podem reconhecer através de um vasto repertório de recetores, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) desencadeando uma resposta de imunidade (PTI) ou reconhecer efetores específicos, desencadeando a imunidade por efetores (ETI) (Jones and Dangl, 2006; Brugger et al. 2006; Bari and Jones, 2009; Kachroo and Kachroo, 2009; He et al. 2012). A ETI pode ser induzida quando um gene avirulento (*Avr*) do patógeno interage com gene de resistência (*R*) da planta (interação “gene para gene”) (Yang et al. 1997; Kachroo and Kachroo, 2009). Na interação incompatível (resistência), existe o reconhecimento dos genes de virulência ou efetores dos patógenos pela planta e é desencadeada uma resposta de defesa; na interação compatível (suscetibilidade) não existe um reconhecimento eficiente do patógeno e a consequente a ativação da resposta de defesa é deficitária (Glazebrook, 2005).

O reconhecimento e a interação dos patógenos com a planta pode desencadear diferentes respostas, desde a produção de compostos antimicrobianos, alterações morfológicas e bioquímicas, ativação de vias de sinalização de defesa (Yang et al. 1997; Bari and Jones, 2009; Kachroo and Kachroo, 2009).

1.1.1 Resposta de Hipersensibilidade (HR)

Nas interações incompatíveis é característico o estabelecimento de uma resposta hipersensível (HR) resultando na rápida morte celular do tecido infetado de forma a matar o patógeno e prevenir a sua propagação para tecidos saudáveis (Mehdy, 1994; Beckers and

Spoel, 2005). Além da HR, localmente eficaz, são ativadas defesas para partes não infetadas da planta para responder a infecções subsequentes. A resistência induzida biologicamente nos tecidos sistêmicos é conhecida por resistência sistêmica adquirida (SAR) (Yang et al. 1997; Beckers and Spoel, 2005). A HR é caracterizada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), produção de compostos antimicrobianos, como as fitoalexinas, produção de compostos fenólicos, indução de proteínas relacionadas com patogenicidade (PR) e a acumulação de fitohormonas (Hammond-Kosack and Jones, 1996; Yang et al. 1997; Health, 2000).

1.1.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

As ROS (ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2)) são produzidas no metabolismo celular normal das plantas. Estas moléculas podem ser benéficas ou prejudiciais dependendo da sua concentração nas plantas. Em baixas/moderadas concentrações podem atuar como sinais mensageiros em cascatas de sinalização, participar em reações de defesa no apoplasto e desempenhar um papel chave na sinalização da morte celular programada nas plantas (Breusegem and Dat, 2006; Sharma et al. 2012). No entanto elevados níveis de ROS podem atuar como indutores de stress oxidativo, causando a peroxidação de lípidos, a oxidação de proteínas, danos nos ácidos nucleicos, inibição de enzimas, afetando o funcionamento celular normal (Breusegem and Dat, 2006; Sharma et al. 2012). Desta forma é necessário um controlo rigoroso dos níveis de ROS para garantir as funções de sinalização destas moléculas e para evitar a toxicidade (Sgobba et al. 2015).

As células vegetais contêm vários sistemas de eliminação de ROS, enzimáticos e não enzimáticos. Entre elas, as principais enzimas de eliminação das ROS enzimáticos são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e peroxiredoxina (PrxR), que são produzidas para manter a homeostasia *redox* e evitar desintegração celular por ROS durante as interações planta – patógeno. O ascorbato (AsA), glutathione (GSH), carotenoides, tocoferóis e fenólicos servem como antioxidantes não - enzimáticos (Mandal et al. 2011; Sharma et al. 2012; Brossa et al. 2014).

As ROS podem ativar a expressão de genes de defesa, alterando o estado *redox* das células das plantas, modulando a atividade de fatores de transcrição e aumentando a biossíntese de fitohormonas (Yang et al. 1997).

1.1.3 Ácidos Gordos (FAs) nas membranas celulares

Os FAs são a principal fonte de energia de reserva e componentes cruciais das membranas celulares, funcionando como barreiras estruturais (Kachroo and Kachroo, 2009; Upchurch, 2008). Para além de componentes estruturais e metabólicos da célula, os FAs e os seus derivados são moléculas de sinalização e modeladores de vias de transdução do sinal, conseguem alterar propriedades funcionais de componentes de sinalização e respostas celulares (Walley et al. 2013). Os FAs podem contribuir para indução de resistência a stresses através de alterações na composição lipídica da membrana. O ajustamento da fluidez da membrana por alteração dos níveis de FAs insaturados é mediada pela atividade de dessaturases de ácidos gordos (Upchurch, 2008; Walley et al. 2013). Os FAs polinsaturados, como, o ácido α -linolénico (C18:3) são os principais componentes de lípidos da membrana e estão envolvidos em respostas de defesa contra agentes patogénicos (Walley et al. 2013).

1.1.4 Fitohormonas

As plantas produzem uma ampla variedade de fitohormonas, porém, o ácido salicílico (SA), o ácido jasmónico (JA) e o etileno (ET) são consideradas as três principais (Antico et al. 2012; Bari and Jones, 2009). As respostas de defesa das plantas são reguladas através da interligação complexa de vias de sinalização, em que o SA e JA desempenham funções importantes. As vias de defesa do SA e do JA são consideradas antagonistas e sinérgicas (Beckers and Spoel, 2005; Bari and Jones, 2009; Pieterse et al. 2012). Dependendo do tipo de agente patogénico, diferentes vias de sinalização podem ser activadas. Por exemplo, uma sinalização por SA é preferencialmente ativada em resposta a patógenos biotróficos (alimentam-se em tecido vivo), enquanto que uma sinalização por JA é preferencialmente ativada em resposta a patógenos necrotróficos (matam as células do hospedeiro antes de se alimentar) (Glazebrook, 2005; Pena-Cortes et al. 2005; Bari and Jones, 2009; Ballaré, 2010).

Recentemente, verificou-se que certas espécies de fungos biotróficos activam respostas mediadas por JA e que mutantes deficientes na sinalização por JA demonstram um aumento de suscetibilidade a certos fungos biotróficos (Hamiduzzaman et al. 2005; Belhadj et al. 2006; Belhadj et al. 2008; Trouvelot et al. 2008).

1.2 Ácido Jasmónico (JA)

O JA é uma oxilipina, uma das mais importantes moléculas de sinalização. As oxilipinas são derivadas da oxigenação de ácidos gordos (FAs) polinsaturados. O JA está envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos (Ballaré, 2010; Santino et al. 2013).

1.2.1 Biossíntese do JA

A biossíntese do JA é um processo muito complexo que requer três compartimentos celulares e diversos intermediários (figura 1), (Wasternack and Hause, 2013).

O primeiro passo da síntese do JA ocorre no cloroplasto, onde o FA ácido α -linolénico (C18:3) é libertado a partir dos lípidos da membrana do cloroplasto através da atividade da fosfolipase A1 (PLA1) (Ishiguro et al. 2001; Hyun et al. 2008; Kachroo and Kachroo, 2009; Dave and Graham, 2012; Wasternack and Hause, 2013). A seguir, o C18:3 é oxidado pela ação da 13-lipoxigenase (13-LOXs) formando o *13S-hydroperoxy (9Z,11E,15Z) octadecatrienoic acid* (13-HPOT) (Vick and Zimmerman, 1983; Melan et al. 1993; Bannenberg et al. 2009; Figueiredo et al. 2015). Entre as seis LOXs de *Arabidopsis*, quatro delas são de 13-LOXs (LOX2, LOX3, LOX4, LOX6) (Bannenberg et al. 2009) e, até à data, apenas a LOX2 tem um papel bem caracterizado na síntese do JA (Schommer et al. 2008; Glauser et al. 2009). Posteriormente há uma ação sequencial da enzima *allene oxide synthase* (AOS) e *allene oxide cyclase* (AOC) e é sintetizado o *cis- (+) - 12-oxo-phytodienoic acid* (OPDA) (Kachroo and Kachroo, 2009; Figueiredo et al. 2015). Finalmente, o OPDA é transportado para o peroxissoma onde sofre redução pela *oxophytodienoate reductase 3* (OPR3) e posteriormente, várias reações de β -oxidação formando o JA (Kachroo and Kachroo, 2009; Dave and Graham, 2012).

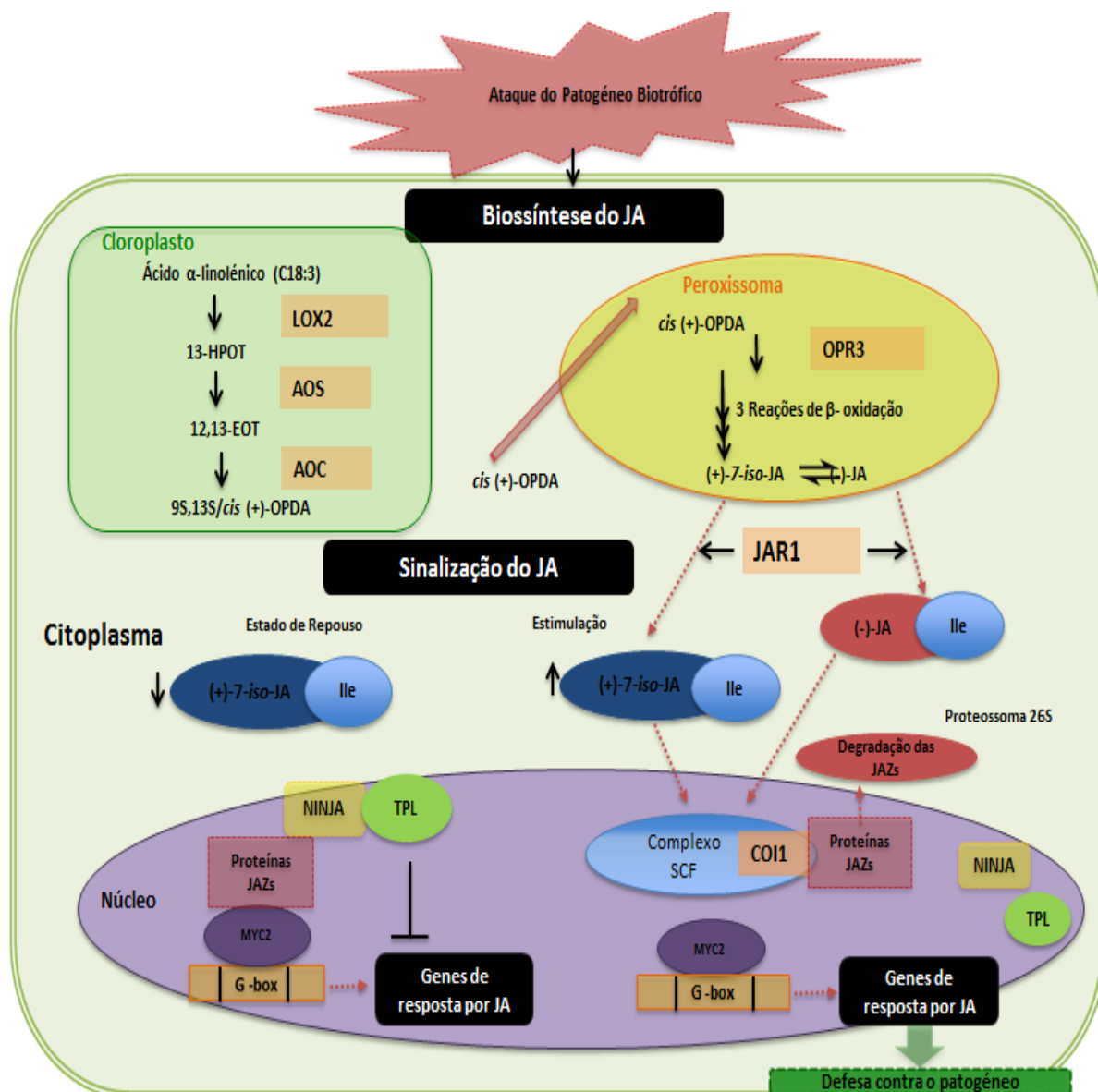


Figura 1- Representação do processo de biossíntese do Ácido jasmônico (JA) e da sua forma bioativa a partir do ácido α -linolênico (C18:3) e da sinalização por JA. AOC, *allene oxide cyclase*; AOS, *allene oxide synthase*; COI1, *coronatine insensitive 1*; Complexo SCF, complexo *Skp1-Cullin1-F-box protein*; 12,13-EOT, *12,13-epoxy-9-Z,11,15-Z-octadecatrienoic acid*; 13-HPOT, *(13S)-hydroperoxyoctadecatrienoic acid*; (+)-7-iso-JA, *(+)-7-iso-jasmonic acid*; (-)-JA, *(-)-jasmonic acid*; JAR1, *jasmonate-amido synthetase*; JAZs, *Jasmonate ZIM domain proteins*; LOX 2, *lipoxigenase 2*; MYC2, *basic helix-loop-helix Leu zipper transcription factor*; NINJA, *novel interactor of JAZ/TIFY*; OPR3, *OPDA reductase 3*; 9S,13S/cis(+)-OPDA, *(9S,13S)-12-oxo-cis-10,15- phytodienoic acid*; TPL, *TOPLESS*, (Adaptada a partir de Wasternack and Hause, 2013; Figueiredo et al. 2015).

1.2.2 Sinalização associada ao JA

Após a síntese do JA, este metabolito é exportado para o citoplasma para ser conjugado com o aminoácido isoleucina por ação da enzima *Jasmonate - amido synthetase* (JAR1), resultando na forma bioactiva ácido jasmónico com isoleucina (JA-Ile), (Staswick and Tiriyaki, 2004; Fonseca et al. 2009).

Quando os níveis de JA-Ile são elevados, a proteína *coronatine insensitive 1* (COI1), uma parte integral do complexo *SKP-Cullin-F-box protein* (SCF), funciona como co-receptor do JA-Ile (figura 1). Quando o COI1 reconhece o JA-Ile promove a ligação das *jasmonate ZIM domain proteins* (JAZs) ao COI1 levando à ubiquitinação e a subsequente degradação das proteínas JAZs pelo proteossoma 26S (Chini et al. 2009; Kachroo and Kachroo, 2009; Ballaré, 2010; Santino et al. 2013). A família de proteínas JAZs medeia a interação com o fator de transcrição *basic helix-loop-helix Leu zipper* (MYC2) e com o COI1, o domínio ZIM destas proteínas é responsável pela dimerização das JAZs e interação com proteína adaptadora, *Novel Interactor of JAZ/TIFY* (NINJA). As proteínas JAZs são repressoras da expressão dos genes de resposta do JA (Wasternack and Hause, 2013). De forma a reprimir a atividade transcripcional de factores de transcrição e da expressão de genes, recrutam o co-repressor *TOPELESS* (TPL) ou proteínas relacionadas com *TOPELESS* (TPRs) através da proteína NINJA (figura 1). Logo, o TPL e o NINJA funcionam como reguladores negativos das respostas do JA (Pauwels et al. 2010; Kazan and Manners, 2013). Desta maneira, com a degradação das JAZs, a repressão sobre o fator de transcrição MYC2 e outros factores de transcrição é libertada. O MYC2 é ativado e liga-se a elementos específicos (sequência *cis-acting G-box*) dos promotores dos genes de resposta do JA promovendo a transcrição dos genes efetores de defesa (Antico et al. 2012; Wasternack and Hause, 2013).

Embora a sinalização do JA esteja extensivamente a ser estudada, a sua ligação à resistência a fungos biotróficos é recente, sendo necessário um estudo mais detalhado da sua participação nesta interação.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo determinar se o mecanismo de resistência da videira ao fungo biotrófico *P. viticola* é mediado por uma via de sinalização dependente do ácido jasmónico.

Foi efetuada:

- 1) Determinação de espécies reativas de oxigénio induzida pelo patogéneo, peroxidação de lípidos e capacidade antioxidante em dois genótipos de *Vitis vinifera*, a cultivar ‘Regent’ (resistente) e a cultivar ‘Trincadeira’ (suscetível);
- 2) Determinação da composição de ácidos gordos na membrana celular nos dois genótipos de videira por cromatografia gasosa (GC);
- 3) Quantificação de fitohormonas (JA, MeJA, JA-Ile e SA) durante a interação da cultivar de *V. vinifera* ‘Regent’ (resistente) com o fungo *P. viticola*;
- 4) Identificação do perfil de transcrição de genes da sinalização por JA e controlo das vias do JA e SA por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) no genótipo resistente.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material vegetal

Os genótipos utilizados neste estudo foram *V. vinifera* cultivar ‘Regent’ e cultivar ‘Trincadeira’. O genótipo ‘Regent’ é um híbrido intraespecífico criado no *Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof* que apresenta um elevado grau de resistência tanto ao míldio como ao oídio e registado como casta de *V. vinifera*. A ‘Trincadeira’ é uma cultivar de *V. vinifera* tradicional Portuguesa, suscetível ao *P. viticola*.

3.2 Inoculação de *V. vinifera* com *P. viticola*

Os esporângios do *P. viticola* foram recolhidos após a incubação em folhas sintomáticas na estufa (90-100% de humidade e temperatura ambiente). Posteriormente, verificou-se a sua vitalidade por microscopia, através da sua forma e aparência. A parte inferior das folhas das duas cultivares foi pulverizada com uma suspensão de 10^4 esporângios/ml; paralelamente fez-se o mesmo procedimento mas com água (controlo). As plantas foram inoculadas ao mesmo tempo, de seguida, foram expostas às mesmas condições (mantidas numa câmara húmida durante 8 horas, com uma temperatura compreendida entre os 25°C e os 30°C). Começou-se a comparar o material vegetal (3 a 5 folhas a contar do ápice) recolhido às 6, 12 e 24 horas após a inoculação (hpi). As amostras foram imediatamente congeladas em azoto líquido, maceradas e armazenadas a -80°C. Três réplicas biológicas foram realizadas para cada tempo.

3.3 Produção de ROS e Capacidade Antioxidante

3.3.1 Extração de proteínas

Utilizou-se 100mg de material macerado de plantas suscetíveis e resistentes nos diferentes tempos de inoculação e controlo, que foi homogeneizado com uma solução de tampão fosfato de potássio (50mM, pH7.2) a 4°C em conjunto com areia de quartzo (Merek KGa, Darmstadt, Germany) e polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVPP), (Polydar AT, Serva). As amostras foram centrifugadas a 16000g durante 1 minuto e o sobrenadante foi recolhido.

3.3.2 Quantificação da Proteína

O conteúdo total de proteína usado para normalizar os dados de produção de ROS e capacidade antioxidante, foi medido usando o *QuantiPro™ BCA Assay* (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante.

3.3.3 Produção de ROS - Determinação da concentração de H₂O₂

Utilizaram-se os extratos de videira como substrato oxidante e o *2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)* (ABTS) como substrato redutor (Fuentes et al. 2004). A atividade foi determinada por espectrofotometria, registando o aumento na absorvância a 405nm, promovido pelo produto de oxidação do ABTS. As ROS foram quantificadas a partir da equação da curva padrão, para a qual se utilizou o H₂O₂ como substrato oxidante. Foram utilizadas três réplicas biológicas para cada condição.

3.3.4 Determinação Capacidade Antioxidante total

Neste ensaio usou-se o *Antioxidant Assay Kit* (Sigma-Aldrich) para medir a capacidade antioxidante total das cultivares 'Regent' e 'Trincadeira' antes e após a inoculação com o fungo *P. viticola*. O princípio do ensaio consiste em utilizar o H₂O₂ como dador de ROS. Há a formação de um radical de mioglobina ferril a partir da metamioglobina e H₂O₂, que oxida o ABTS para produzir um catião radical ABTS^{•+}, que pode ser determinada espectrofotometricamente a 405 nm. A capacidade antioxidante foi quantificada através da equação da curva padrão de *6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid* (Trolox). O trolox é análogo da vitamina E solúvel em água que foi utilizado como padrão ou controlo antioxidante. Este antioxidante suprime a produção do catião radical, e consequentemente, a concentração e a intensidade da cor diminui proporcionalmente. Foram utilizadas três réplicas biológicas para cada condição.

3.4 Peroxidação dos Lípidos

O conteúdo de dialdeído malónico (MDA) foi estimado pelo ácido tiobarbitúrico (TBA), de acordo com método das substâncias reativas e tiobarbitúrico (TBARS) (adaptado de Hodges et al. 1999). O MDA resulta da reação das ROS com os ácidos gordos polinsaturados dos lípidos membranares. Utilizaram-se 100mg de material macerado que foram homogeneizados em etanol 80% (v/v em H₂O) e centrifugados a 14 000g durante 5 minutos a 4°C. De seguida, recolheu-se o sobrenadante perfazendo o volume a 2ml com etanol. Os sobrenadantes reagiram com o TBA a 95°C durante 30 minutos. Após a centrifugação a 14 000 g durante 10 minutos a 4°C, foram determinadas as absorvâncias a 440nm, 532nm e 600nm. O composto que resulta da reação do MDA com o TBA absorve a 532nm. As leituras a 440nm e 600nm permitiram corrigir para a absorção não específica de antocianinas e açúcares presentes nos tecidos vegetais, respetivamente.

Os equivalentes do MDA (nmolml⁻¹) = [(A-B) x 10⁶]/157000, em que A = [(Abs532nm TBA +) - (Abs 600nm + TBA)] - [(Abs 532nm - TBA) - (Abs 600nm - TBA)] e B = [(Abs 440nm TBA +) - (Abs 600nm + TBA)] x 0,0571]. Foram utilizadas três réplicas biológicas para cada condição.

3.5 Quantificação dos ácidos gordos totais

Os ésters metílicos de ácidos gordos (FAs) foram preparados por trans-esterificação direta com metanol/ácido sulfúrico (97,5/2,5, v/v) a 70°C durante 60 minutos (Metcalf et al. 1966) e analisados por GC (3900 Gas Chromatograph, Varian) a 210°C, equipado com um detector de ionização de chama de hidrogénio. A separação foi feita numa coluna capilar de sílica (0.25 mm i.d. x 50m, WCOT Fused Silica, CP-Sil 88, Varian). Para a análise quantitativa dos ésteres metílicos de FAs foi utilizado o heptadecanoato de metilo (C17:0) como padrão interno (400 µg/ml) (Matos et al. 2009). O índice de duplas ligações (DBI) foi calculado de acordo com a fórmula DBI=Σ (% de ácidos gordos x no. de duplas ligações) /100. Os restantes parâmetros correspondem à média das proporções relativas (%) das quatro réplicas técnicas e as razões dos FAs saturados, FAs insaturados e FAs saturados sobre os insaturados.

3.6 Extração de RNA

Utilizou-se cerca de 100mg de material vegetal macerado. O RNA total (RNAt) foi extraído com o *Plant Total RNA Kit* (Sigma-Aldrich), de acordo, com as instruções do protocolo do *Kit*. Posteriormente, as amostras foram tratadas com uma DNase (*Turbo DNA-freeTM Kit*

Ambion, Inc., USA) para degradar o DNA genómico residual, seguindo as instruções do *kit*. Todas as soluções usadas foram tratadas com dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma).

3.7 Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total de acordo com o descrito previamente em Monteiro et al. (2013).

3.8 Eletroforese de Gel em Agarose

A integridade do RNA^t e do cDNA foi avaliada por eletroforese em agarose 1% (p/v, UltraPureTM Agarose, Carlsbad, USA) em solução tampão TBE 1X (diluído a partir de uma solução stock 20X concentrada, 800 mM Tris-acetato, 20 mM EDTA, pH8.0). O gel foi corado com *GelRED* (1000x) (Biotium, Hayward, USA) e a imagem avaliada a partir do sistema de captação de imagem, *Gel DocTM XR System* (BioRad Laboratories, Milan, Itália).

3.9 Seleção de genes para o qPCR e desenho de *primers*

Foram selecionados 10 genes das vias de interesse. Os genes *jasmonate ZIM domain protein 1* (*JAZ1*), *jasmonate ZIM domain protein 3* (*JAZ3*), *basic helix-loop-helix Leu zipper transcription factor* (*MYC2*), *Novel interactor of JAZ* (*NINJA*), *TOPELESS* (*TPL*) e *pathogenesis related gene 10* (*PR10*) estão associados com a sinalização por JA. Os genes *Nonexpresser genes PR1* (*NPR1*) e *pathogenesis related gene 1* (*PR1*) estão relacionados com a sinalização por SA. E os genes *WRKY DNA-Binding protein 70* (*WRKY70*) e *MYB domain protein 44* (*AtMYB44*) estão relacionados com o controlo da relação entre ambas as vias de sinalização (Wasternack and Hause, 2013; Shim et al. 2013). Os genes *Elongation factor 1α* (*EF1α*), *glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) e *poly-ubiquitin* (*UBQ*), previamente descritos por Monteiro et al. (2013), foram usados para normalização da expressão génica na cultivar ‘Regent’. Quando os genes não estavam descritos em videira (*NINJA*, *WRKY70*, *AtMYB44*) foram utilizadas as sequências homólogas às dos genes descritos em *Arabidopsis* (*The Arabidopsis Information Resource* - TAIR) presentes na base de dados *Grape Genome*. A ferramenta de alinhamento *Bioedit software version 7.2* (Applied Biosystems, Sourceforge, USA) foi utilizada para alinhar ambas as sequências e selecionar as zonas mais conservadas. Os *primers* específicos da videira (tabela 1 em anexo I) foram desenhados com *Primer Express software version 3.0* (Applied Biosystems, Sourceforge, USA) com os seguintes parâmetros:

tamanho 80-200bp; temperatura de *melting* (T_m) entre 55 e 60°C, conteúdo em GC entre 40 e 60%.

3.10 qPCR

Foi preparada um *pool* com 1µl de cada cDNA das amostras controlo e das amostras inoculadas com fungo nos diferentes tempos, do qual fez-se uma diluição (1:20). A partir desta, fez-se diluições seriadas (1:10) para a curva padrão. Para uma reação de qPCR usou-se 12.5µl de *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) Kit* (Fermentas, Ontário, Canadá), 0.5µl de cada *primer* (10µM), juntamente com 4µl de cDNA (diluído 1:40 a partir do cDNA original), para reações de 25µl de volume total, num sistema de *Real Time StepOne™ PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O qPCR para todos os genes começou com um passo de desnaturação a 95°C durante dez minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e temperatura de *annealing* (T_a , Tabela 1 anexo I) por 30s. Foram feitas três réplicas biológicas e duas repetições técnicas para cada condição e tempo. A eficiência de amplificação é calculada a partir da fórmula $10^{(-1/S)}$, onde o S representa o declive da curva padrão. A expressão relativa de cada gene foi calculada segundo o método de Hellemans et al. (2007).

3.11 Quantificação das fitohormonas

Utilizou-se cerca de 100mg de material vegetal macerado da cultivar ‘Regent’ nos diferentes tempos de inoculação e controlo, para quantificar o JA, o JA-Ile, OPDA e o SA. Este ensaio foi realizado no *Donald Danforth Plant Science Center*, nos Estados Unidos, através de um serviço.

3.12 Análise Estatística

O significado estatístico ($p \leq 0,05$) foi determinado para as diferentes análises referidas anteriormente teste *Mann–Whitney U* utilizando o *software IBM® SPSS® Statistics Versão 20.0* (SPSS Inc., USA).

4. Resultados e Discussão

4.1 Indução de ROS

A produção de ROS é considerada uma das primeiras linhas de defesa em interações compatíveis e incompatíveis entre a planta e o agente patogénico (Mandal et al. 2011) desempenhando um papel crucial na sinalização e no mecanismo de defesa da planta (Tománková et al. 2006; Sharma et al. 2012).

Ao comparar os dois genótipos de videira, resistente e suscetível, verifica-se que a cultivar resistente, 'Regent' apresenta maior concentração de ROS intracelulares (figura 2), apresentando um pico de ROS muito cedo, às 6hpi ($199,40 \pm 60,85$ mmol H_2O_2 equiv. /mg proteína; figura 2a) em comparação com o controlo. Na cultivar suscetível as variações da concentração intracelular de ROS são mais baixas, apesar de se verificar um incremento às 12hpi ($67,61 \pm 8,52$ mmol H_2O_2 equiv. /mg proteína; figura 2b) em relação ao controlo. Estes dados estão em acordo com outros estudos que relatam um aumento da concentração de ROS mais cedo no genótipo resistente do que no suscetível em muitas interações planta – patógeno (Tománková et al. 2006; Chen et al. 2008; Mandal et al. 2011). O *oxidative burst* no nosso estudo foi caracterizado por um único aumento de ROS em ambos os genótipos, às 6 horas após inoculação (hpi) na 'Regent' e às 12hpi na 'Trincadeira'. Em estudos realizados em tomate e soja, o *oxidative burst* é caracterizado por único aumento de ROS nas plantas suscetíveis e por dois aumentos de ROS nas plantas resistentes (Tománková et al. 2006; Chen et al. 2008; Mandal et al. 2011). De acordo com Tománková et al. (2006), o primeiro aumento de ROS pode participar na transdução do sinal e no retardamento do desenvolvimento do patógeno e o segundo pode estar associado a várias reações peroxidativas levando ao aumento da defesa das plantas infetadas através HR. Um aumento bifásico de ROS também poderá ocorrer na 'Regent', no entanto como só foram analisados tempos de inoculação até às 24hpi, não conseguimos detetar esse segundo *burst* de ROS na cultivar resistente.

Verifica-se também que a cultivar resistente apresenta uma grande oscilação de ROS no controlo (figura 2a) o que pode estar associado à produção de ROS pelo aparelho fotossintético seguindo o ciclo circadiano (Dodd et al. 2005; Hotta et al. 2007).

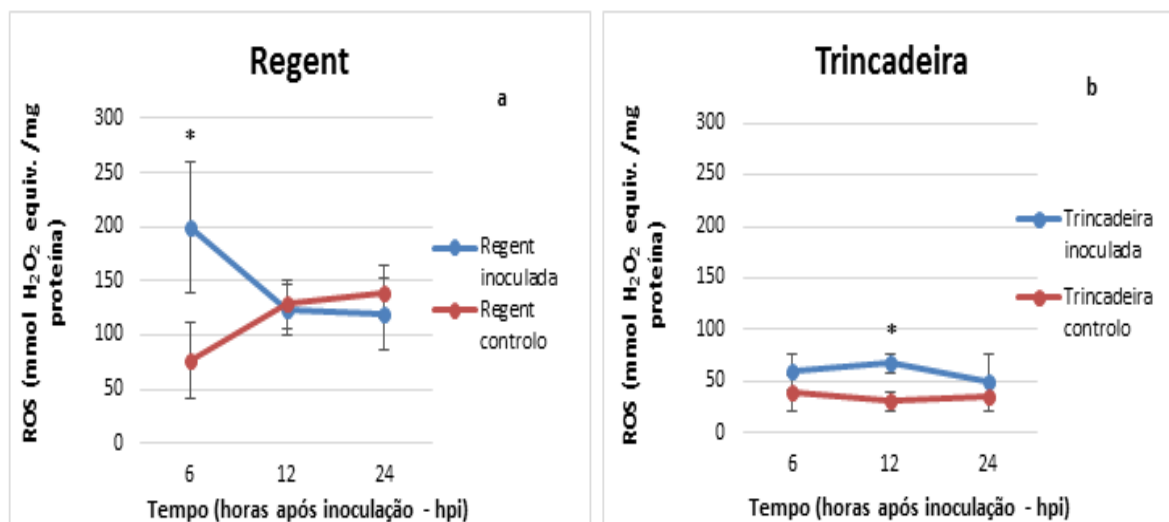


Figura 2 - Representação gráfica da comparação da produção de ROS (expressa em mmol H₂O₂ equivalentes /mg proteína) entre as amostras inoculadas com *P. viticola* e o controle para as cultivares 'Regent' (a) e 'Trincadeira' (b) às 6, 12 e 24 horas após inoculação (hpi). Os resultados apresentados são médias de três réplicas biológicas, as barras correspondem ao desvio padrão e o * indica as diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Estes resultados parecem indicar que a produção de ROS por ambas as cultivares de videira após inoculação com o *P. viticola* é uma das estratégias de defesa contra os agentes patogênicos sendo que esta produção de ROS é muito mais rápida e acentuada na cultivar resistente, o que poderá estar relacionado com uma ativação mais rápida de processos de sinalização.

4.2 Peroxidação dos lípidos

Os danos celulares causados pelas ROS podem ser estimados através dos produtos da peroxidação dos lípidos da membrana celular (Tománková et al. 2006; Mandal et al. 2011). O MDA é um dos produtos finais da peroxidação, sendo utilizado como indicador de danos celulares. O aumento da peroxidação dos lípidos está relacionado com aumento de produção de ROS (Chen et al. 2008; Sharma et al. 2012). A peroxidação em ambas as cultivares aumentou após a inoculação com *P. viticola* (figura 3). No entanto, o conteúdo de MDA às 12hpi foi muito maior no genótipo resistente ('Regent': $49,26 \pm 8,94$ MDA equivalentes nmol g^{-1} ; 'Trincadeira': $30,59 \pm 4,59$ MDA equivalentes nmol g^{-1} ; figura 3). Após este período, a peroxidação lipídica continua a aumentar na 'Trincadeira' mas a diminuir na 'Regent'.

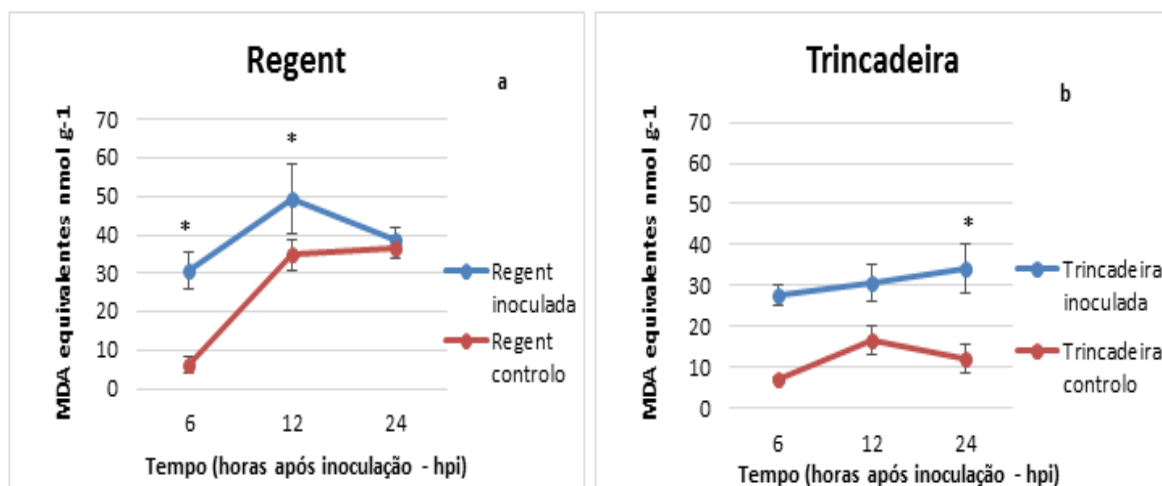


Figura 3 - Representação gráfica da comparação da peroxidação dos lípidos (expressa em MDA equivalentes nmol g⁻¹) entre as amostras inoculadas com *P. viticola* e o controlo para as cultivares 'Regent' (a) e 'Trincadeira' (b) às 6, 12 e 24 horas após inoculação (hpi). Os resultados apresentados são médias de três réplicas biológicas, as barras correspondem ao desvio padrão e o * indica as diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Os nossos resultados estão de acordo com os estudos de Tománková et al. (2006) que relatam a deteção de um aumento de conteúdo de MDA mais cedo no genótipo resistente (24 hpi) do que no genótipo suscetível (48hpi) na interação entre o tomate e o míldio.

A produção de peróxidos lipídicos tem sido provada que pode ser induzida por agentes patogénicos e os produtos subsequentes podem possuir uma função de sinalização, estando também associada com a síntese de JA (Gobel et al. 2003; Walley et al. 2013).

4.3 Capacidade Antioxidante

Se as ROS vão infligir danos ou agir como moléculas sinalizadoras depende de um delicado equilíbrio entre a sua produção e controlo pela capacidade antioxidante das plantas. As células exercem um controlo apertado dos níveis de ROS de forma a evitar os danos causados pelo stress oxidativo e por outro lado não os eliminar completamente (Figueiredo et al. 2015, resultados não publicados). O processo de destoxificação de ROS está associado a um sistema antioxidante que pode compreender processos enzimáticos e não enzimáticos (Noctor and Foyer, 1998). Nas videiras analisadas, a capacidade antioxidante não difere muito entre os dois genótipos (figura 4). No entanto, a capacidade antioxidante total na 'Regent' em relação ao controlo é superior às 6hpi ($145,04 \pm 9,40$ mmol equivalentes Trolox/mg proteína; figura 4a), enquanto que na 'Trincadeira' só aumenta após 12hpi ($196,89 \pm 20,17$ mmol equivalentes Trolox/mg proteína; figura 4b).

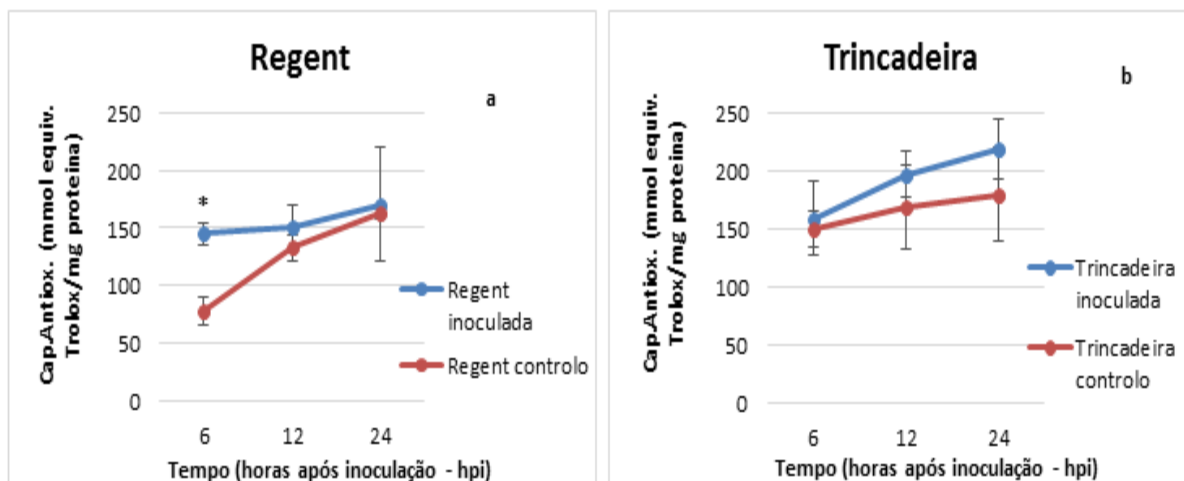


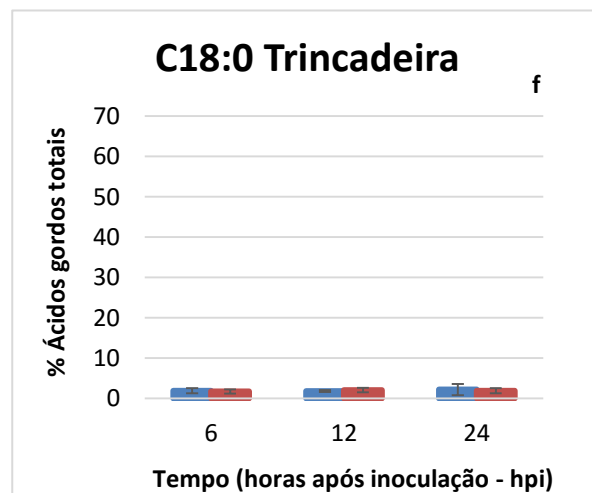
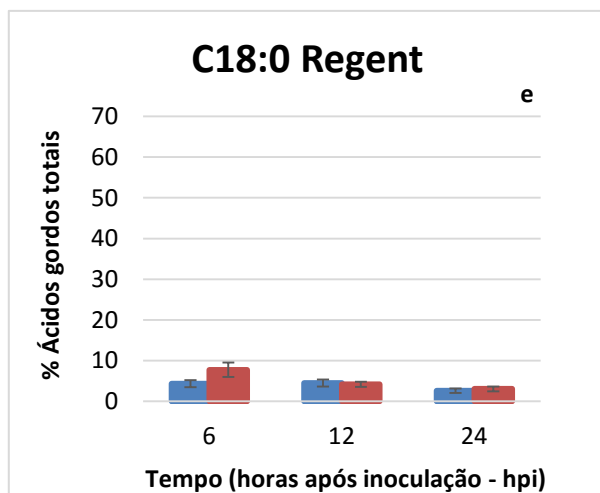
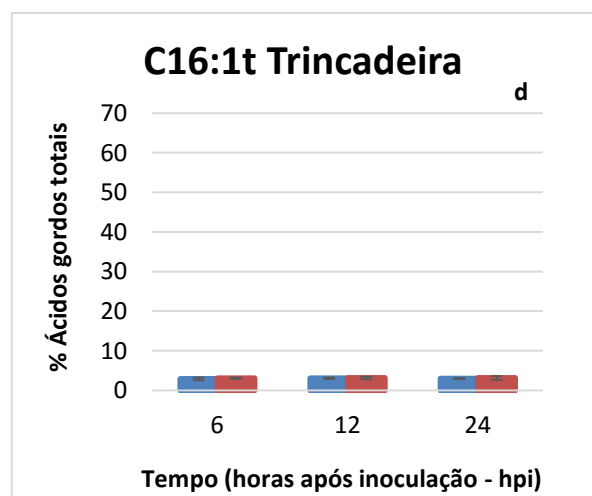
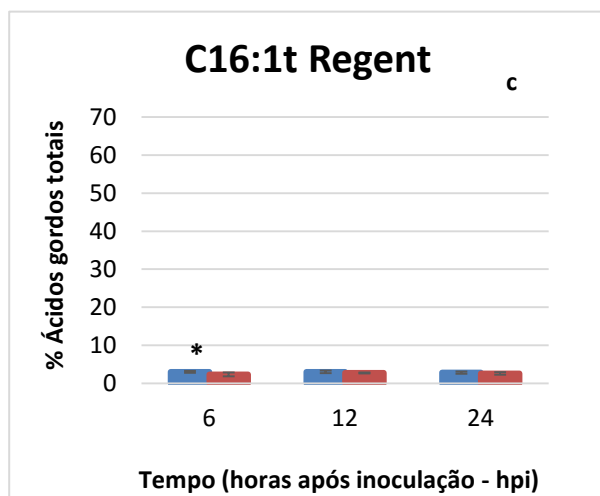
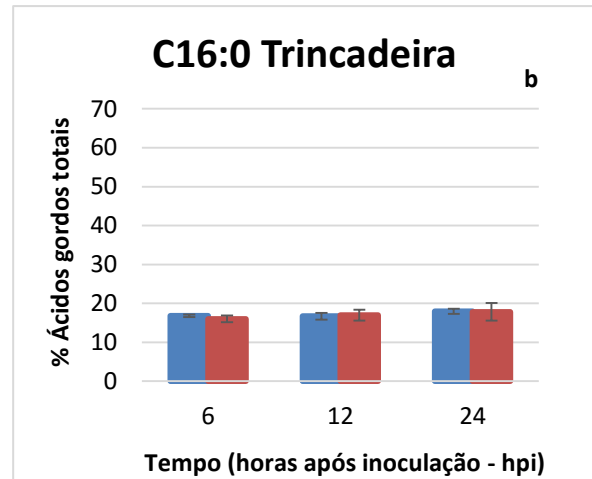
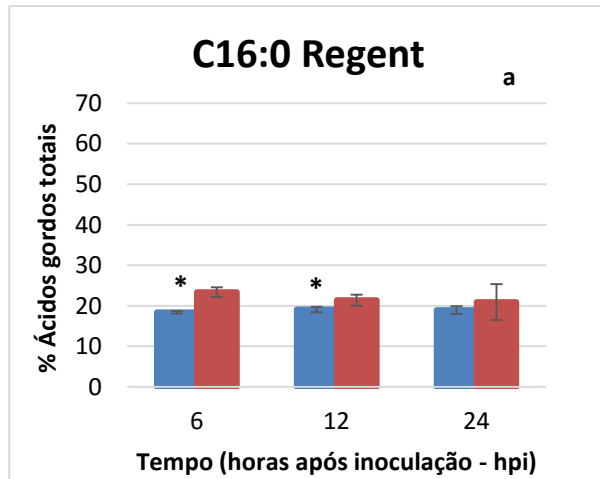
Figura 4 - Representação gráfica da comparação da capacidade antioxidante total (expressa em mmol equivalentes Trolox/mg de proteína) entre as amostras inoculadas com *P. viticola* e o controle para as cultivares 'Regent' (a) e 'Trincadeira' (b) às 6, 12 e 24 horas após inoculação (hpi). Os resultados apresentados são médias de três réplicas biológicas, as barras correspondem ao desvio padrão e o * indica as diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$).

O aumento na capacidade antioxidante da cultivar 'Regent' às 6hpi em relação ao controle parece estar a controlar o *burst* de ROS para evitar os danos mas manter os níveis suficientes de ROS para iniciar processos de sinalização.

4.4 Determinação da composição de FAs nas membranas celulares

Os FAs e os seus derivados são os principais componentes estruturais e metabólicos da célula mas também funcionam como moduladores de uma multiplicidade de vias de transdução de sinal (Walley et al. 2013). Por exemplo, o ácido α -linolénico (C18:3) é um importante FA insaturado presente na membrana que aumenta rapidamente na resposta ao ataque de agentes patogénicos; é libertado a partir dos lípidos da membrana pela enzima fosfolipase A1 (Walley et al. 2013) e funciona como precursor para a via de biossíntese do JA (Mulpuri and Creelman, 2002; Padham et al. 2007; Wasternack, 2007).

Uma vez que a composição dos FAs pode sofrer alterações em resposta a stress (Matos et al. 2009) e que o ácido α -linolénico (C18:3) é um precursor da síntese do JA, fomos analisar a composição dos FAs nos lípidos totais de videira na interação entre as cultivares resistente e suscetível e o *P. viticola*. Nesta análise foram identificados seis FAs, dois saturados: ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0), e quatro insaturados: ácido palmitoleico (C16:1t), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido α -linolénico (C18:3).



■ Controlo ■ Inoculada

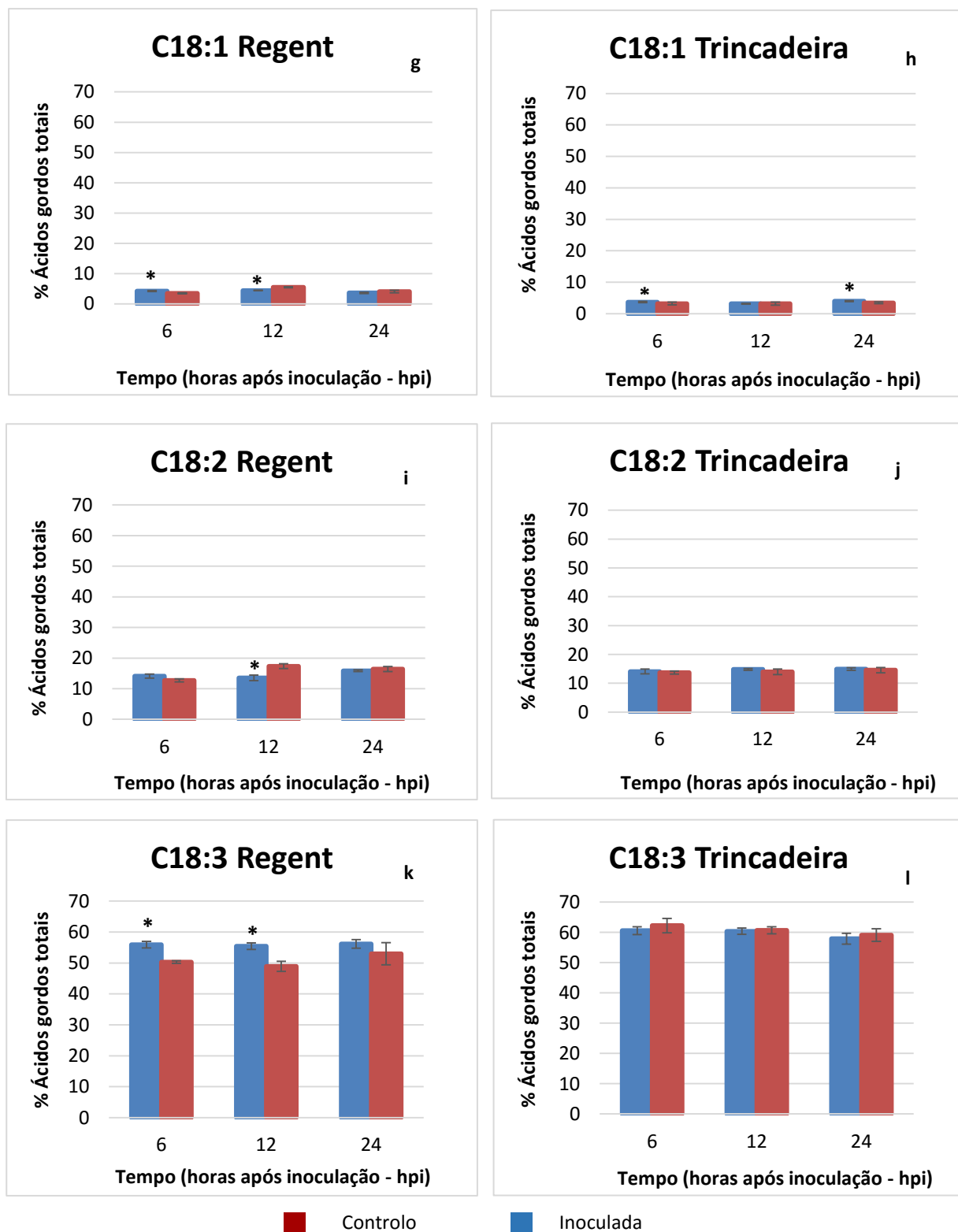


Figura 5 - Representação gráfica da comparação das proporções (%) dos diferentes ácidos gordos (expressa em %) entre as amostras inoculadas com *P. viticola* e o controlo para as cultivares 'Regent' (a, c, e, g, i, k) e 'Trincadeira' (b, d, f, h, j, l) às 6, 12 e 24 horas após inoculação (hpi). Os valores representados são médias de quatro réplicas técnicas, as barras negras correspondem ao desvio padrão e o * indica as diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$).

No desenvolvimento normal da planta, o C18:0 é sintetizado nos plastos a partir de C16:0, posteriormente, ocorre a insaturação progressiva de C18:0 em C18:1, C18:2 e C18:3 (Koussa et al. 2002). Ao avaliar o teor de FAs no decurso da inoculação com *P. viticola* verificou-se uma diferença significativa do teor em C16:0 na 'Regent' às 6hpi ($18,41 \pm 0,30$ %) e às 12hpi ($19,10 \pm 0,66$ %) em relação ao controlo (figura 5a). Na 'Trincadeira' não existem alterações significativas da concentração deste ácido gordo (FA) entre plantas controlo e inoculadas. Para o FA C18:0 não houve nenhuma alteração significativa em ambos os genótipos, apenas foi verificada uma redução do teor deste FA na 'Regent' às 6hpi em comparação com controlo. A razão entre C16:0 e C18:0 aumentou no genótipo resistente às 6hpi e 24hpi (tabela 2 em anexo II) relativamente ao controlo, logo, segundo Koussa et al. (2002) está a ocorrer conversão de C16:0 em C18:0.

Quanto ao C18:1 foram observadas diferenças significativas na 'Regent' às 6hpi ($4,24 \pm 0,14$ %) e às 12hpi ($4,42 \pm 0,04$ %) e na 'Trincadeira' às 6hpi ($3,70 \pm 0,21$ %) e às 24hpi ($4,00 \pm 0,17$ %) em relação ao controlo (figura 5 g, h). Estudos recentes sugerem que os níveis de C18:1 podem estar associados com a regulação da resposta de defesa das plantas contra patógenos incluindo a morte celular programada e resistência sistémica adquirida (SAR) (Upchurch, 2008).

Quanto à composição de C18:2, foram verificadas diferenças significativas às 12hpi ($13,51 \pm 0,90$ %) somente na cultivar resistente. O aumento de C18:2 pode induzir um impedimento estérico e diminuir as trocas de água e de solutos entre as células e o meio externo levando à privação dos nutrientes ao fungo (koussa et al. 2002), o que, no caso da 'Regent' pode estar associado ao estabelecimento da interação incompatível.

Na composição de C18:3 foram verificadas diferenças significativas na 'Regent' às 6hpi ($55,90 \pm 1,06$ %) e às 12hpi ($55,46 \pm 1,05$ %; figura 5k) relativamente ao controlo. Na 'Trincadeira' não existem alterações significativas da concentração do ácido gordo C18:3 entre plantas controlo e inoculadas (figura 5 l). Os nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Ali *et al.* (2012) que reporta uma maior acumulação de ácido α -linolénico na 'Regent' após a inoculação com *P. viticola*. Dessa forma, os nossos resultados podem sugerir que na cultivar resistente, o aumento do conteúdo em C18:3 está relacionado com a biossíntese do JA e dos seus derivados (Upchurch, 2008; Kachroo and Kachroo, 2009).

O grau de insaturação dos lípidos determina a fluidez da membrana (Gomes et al. 2000; Los and Murata, 2004). Alterações na composição de C16:0 e C18:0 e o aumento da razão entre os FAs saturados e os FAs insaturados também podem induzir alterações na fluidez da membrana levando a uma alteração da sua permeabilidade (Koussa et al. 2002). Comparando o teor em FA saturados e insaturados dos dois genótipos após inoculação com o

P. viticola, verificamos que a razão entre os FAs saturados e FAs insaturados é maior na ‘Regent’ do que na ‘Trincadeira’, deste modo, a membrana será menos fluida no genótipo resistente. A fluidez da membrana também pode ser caracterizada pelo índice de duplas ligações (DBI). Quando o DBI apresenta um valor maior indica maior fluidez da membrana, porém, ela pode também estar influenciada pela razão de lípidos e proteínas. A cultivar resistente apresenta valores de DBI menores do que a cultivar suscetível (tabela 2 em anexo II), corroborando a hipótese de que o genótipo resistente apresenta uma membrana menos fluída do que o genótipo suscetível, o que pode representar uma barreira física de entrada do patogéneo.

4.5 Identificação do perfil de expressão de genes envolvidos na sinalização por JA

Muito recentemente, a sinalização por JA foi associada com o estabelecimento da resposta de resistência contra o *P. viticola*. Alguns trabalhos reportaram a sobre-expressão da lipoxigenase (LOX) e dos genes de resposta ao JA (Hamiduzzaman et al. 2005), a sobre-expressão de *allene oxide cyclase* (AOC), *allene oxide synthase* (AOS) e o aumento dos níveis do JA após a inoculação com *P. viticola* (Polesani et al. 2010), bem como o aumento do ácido α – linolénico após a inoculação com *P. viticola*. (Ali et al. 2012). Recentemente, Figueiredo et al. (2015) reportou um aumento da expressão da LOXO (codifica a LOX2) na ‘Regent’ às 6 horas após inoculação com o *P. viticola*. Os autores observaram um ligeiro aumento da expressão da *allene oxide synthase* (AOS) e um grande aumento da *allene oxide cyclase* (AOC) às 6hpi sugerindo que o reconhecimento do fungo pela cultivar ‘Regent’ ocorre muito cedo na interação e que a ativação da lipoxigenase 2 (LOX2) e AOS pode ocorrer antes das 6hpi (Figueiredo et al. 2015). Estes autores também reportaram que a expressão da AOC e *oxophytodienoate reductase 3* (OPR3) foi significativamente elevada às 6hpi na cultivar resistente (Figueiredo et al. 2015). O gene *jasmonate - amido synthetase* (JAR1), responsável pela conversão do JA na sua molécula bioativa (JA-Ile) aumenta a sua expressão na ‘Regent’ a partir das 18hpi enquanto que na ‘Trincadeira’ não ocorreu uma alteração significativa da sua expressão. A expressão do receptor do JA-Ile (*coronatine insensitive 1* (COI1)) começa a ser regulada positivamente a partir das 24hpi na cultivar resistente, (Figueiredo et al. 2015). Os resultados de Figueiredo et al. (2015) mostram que a ‘Regent’ tem um aumento da regulação das enzimas relacionadas com a biossíntese do JA (LOXO, AOS, AOC e OPR3) e uma ativação dos dois principais componentes de sinalização do JA (JAR1 e COI1).

No presente trabalho fomos avaliar o perfil de expressão de genes envolvidos no controlo da sinalização por JA (*Jasmonate ZIM domain protein 1* (JAZ1), *Jasmonate ZIM domain*

protein 3 (JAZ3), Basic helix-loop-helix Leu zipper transcription factor (MYC2), Novel interaction of JAZ/TIFY (NINJA), TOPLESS (TPL)) e que apresentam uma expressão dependente do JA (*pathogenesis related gene 10 (PR10)*).

Ambas as fitohormonas JA e SA estão associadas às mais importantes vias de sinalização contra patógenos em plantas. Recentemente a sinalização por JA foi implicada na ativação da resposta de defesa contra fungos biotróficos (Hamiduzzaman et al. 2005; Belhadj et al. 2006; Belhadj et al. 2008; Trouvelot et al. 2008; Polesani et al. 2010; Figueiredo et al. 2015), no entanto a sinalização por SA está preferencialmente associada à defesa contra fungos biotróficos estando relacionada com a ativação da morte celular programada e o estabelecimento da resposta de hipersensibilidade (HR) (Antico et al. 2012). Desta forma fomos também avaliar a expressão de genes envolvidos na sinalização por SA (*Nonexpresser genes PR1 (NPR1) e pathogenesis related gene 1 (PR1)*) e no controlo do *cross-talk* entre as duas vias de sinalização (*WRKY DNA-Binding protein 70 (WRKY70), MYB domain protein 44 (AtMYB44)*) para a cultivar resistente 'Regent'.

Os nossos resultados mostram que a expressão do *JAZ1* e do *JAZ3* na 'Regent' começa a aumentar a partir das 6hpi, atingindo um pico às 12hpi, (*JAZ1* - 6hpi: $1,25 \pm 0,03$, 12hpi: $2,72 \pm 0,49$; *JAZ3* - 6hpi: $1,75 \pm 0,29$, 12hpi: $2,70 \pm 1,64$ (*fold change* em relação ao controlo)) e ambos descem a sua expressão às 24hpi (figura 6 a, b). Ainda não está claro como as diferenças nos padrões de expressão dos genes *JAZs* se relacionam com a função das proteínas *JAZs*. Actuais modelos de sinalização do JA colocam a hipótese que os genes *JAZs* são rapidamente induzidos em resposta ao JA de forma a repor as proteínas *JAZs* que foram degradadas pelo complexo SCF^{COI1}, e assim, atenuar a sinalização por JA (Thines et al. 2007; Chico et al. 2008; Demianski et al. 2012). Considerando que os genes *JAZs* são induzidos pelo JA, a sua expressão na 'Regent' está de acordo com o aumento dos níveis do JA e do JA-Ile entre as 6hpi e as 12hpi (resultados apresentados na secção 4.6; figura 7 b, c). Concordante com a ativação da sinalização por JA, a expressão do fator de transcrição *MYC2* aumenta às 12hpi (figura 6 c), este gene é um regulador positivo ativando a expressão dos genes de defesa (Chung et al. 2008). A sua expressão é corroborada pelo aumento da expressão da *PR10* (figura 6 f). Estas proteínas podem ser classificadas em várias famílias (Loon and Strien, 1999). A função biológica e bioquímica de muitas PRs permanece desconhecida (Hashimoto et al. 2004), mas tem sido proposto que as PR10 estão envolvidas nas respostas de defesa mediadas pelo JA e no desenvolvimento (Hashimoto et al. 2004; Kim et al. 2008).

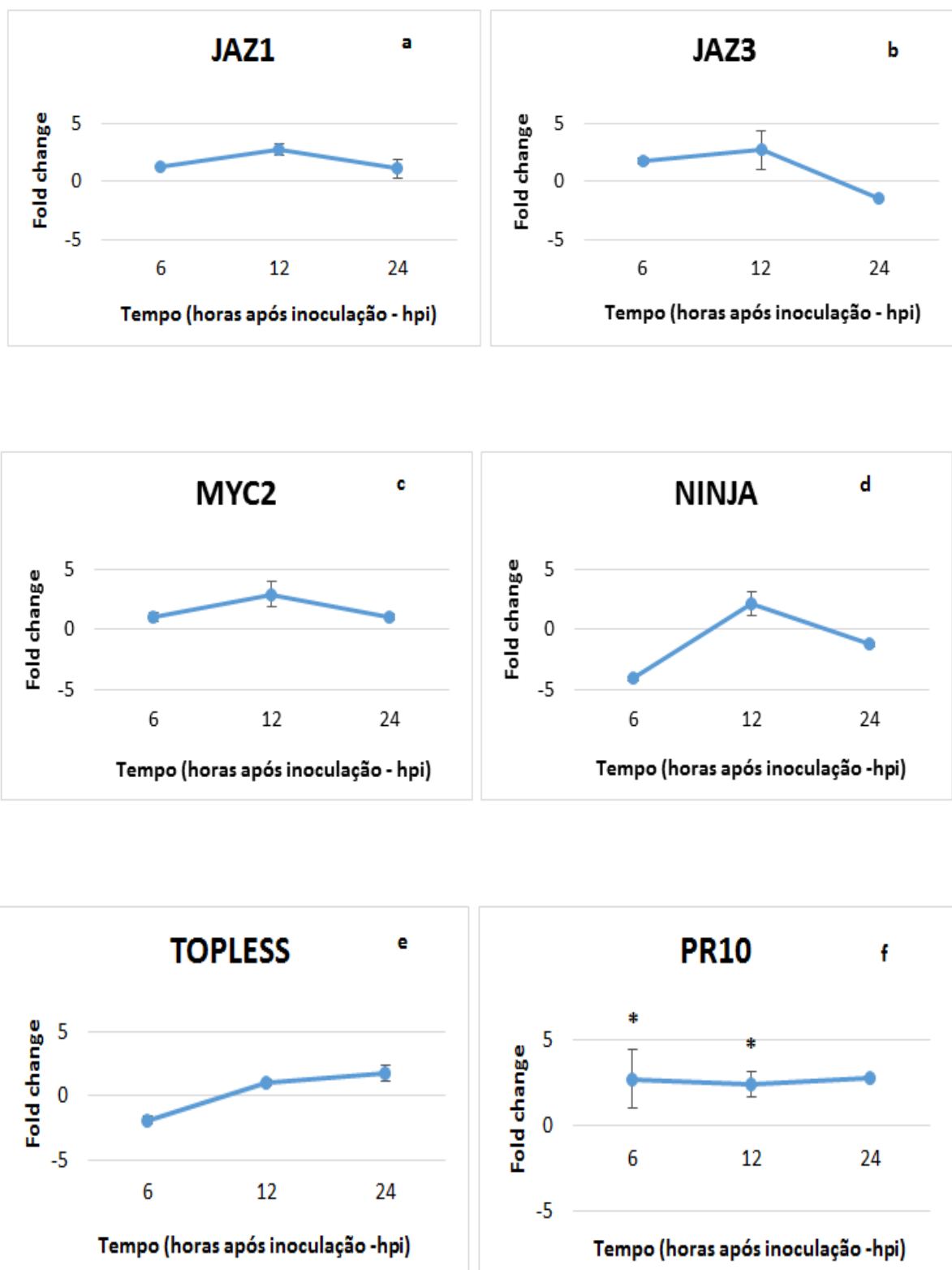
O *NINJA* e o *TOPLESS* são reguladores negativos da sinalização por JA, aumentam a sua expressão às 12hpi (figura 6 d, e) de forma a repor os níveis de proteínas que foram degradadas, porque tal como os genes *JAZs*, eles estão envolvidos no complexo de sinalização.

O NPR1 e o fator de transcrição WRKY70 são considerados reguladores importantes na interação antagonista entre o SA e o JA (Spoel et al. 2003; Liu et al. 2004; Liu et al. 2006). Ambos são essenciais para ativação da expressão dos genes de resposta dependente do SA, incluindo os genes relacionados com patogenicidade (*PR*), como o *PR1*, *PR2* e *PR5*, bem como a supressão da expressão dos genes de defesa ativados pelo JA (Spoel et al. 2003; Liu et al. 2004; Liu et al. 2006; Spoel et al. 2007). Por sua vez, o WRKY70 é regulado através do AtMYB44 e do NPR1, mas eles atuam independentemente um do outro. Segundo os nossos resultados, o *NPR1*, *PR1* e o *WRKY70* aumentaram a expressão às 12hpi (*NPR1* - 12hpi: $3,63 \pm 2,14$; *PR1* - 12hpi: $2,42 \pm 0,51$; *WRKY70* - 12hpi: $2,11 \pm 0,41$ (*fold change* em relação ao controlo); figura 6 g, h, i), parecendo haver uma coordenação entre ambos. Quando WRKY70 aumenta a sua expressão existe um aumento da expressão do gene *PR1* e assim maior resistência contra patógenos biotróficos (Shim et al. 2013).

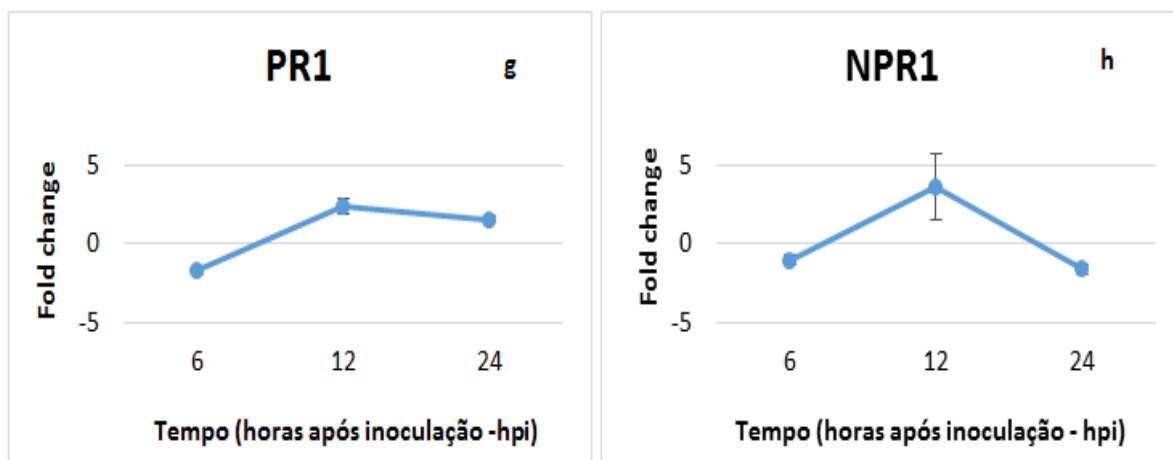
O fator de transcrição AtMYB44 contribui para o estabelecimento das respostas de defesa por regulação direta do WRKY70 no *cross-talk* entre o SA e o JA (Shim et al. 2013). Nas respostas de defesa mediadas pelo SA, o AtMYB44 regula a ativação do *PR1* e suprime os genes defesa mediados pelo JA. Nas respostas de defesa mediadas pelo JA atua como regulador negativo para ajustar o sinal do JA (Liu et al. 2004; Shim et al. 2013). Assim sendo, a inibição da expressão do AtMYB44 na cultivar 'Regent' (figura 6 j), pode estar associada com o aumento do conteúdo em JA nas primeiras horas de interação com o *P. viticola* (resultados apresentados na secção 4.6; figura 7 b).

Em resumo, segundo os nossos resultados nas primeiras horas de interação está a ocorrer a expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização por SA e por JA e um aumento dos níveis endógenos das duas fitohormonas (resultados apresentados na secção 4.6), o que sugere uma cooperação entre as duas vias no início da interação da videira com o fungo *P. viticola*.

Sinalização por JA



Sinalização por SA



Sinalização por JA e SA

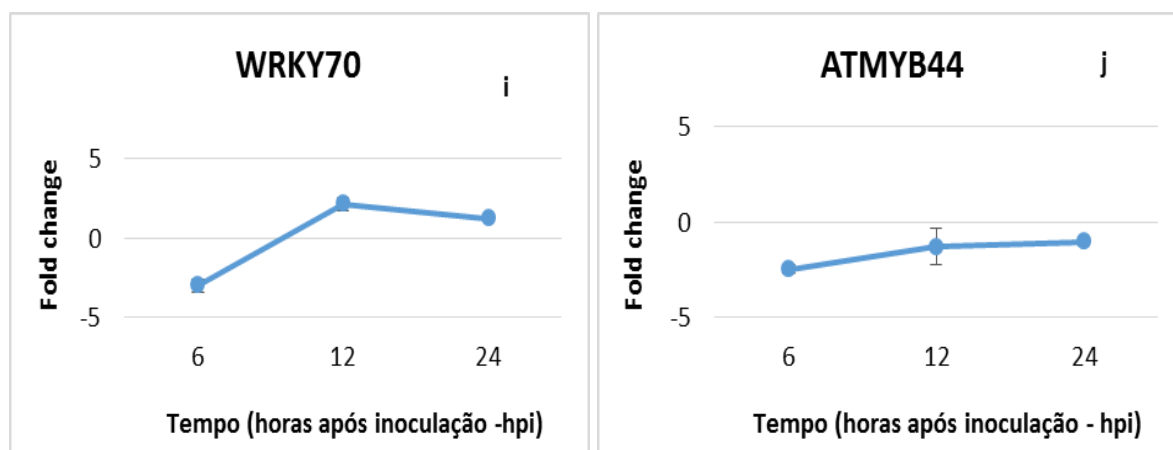
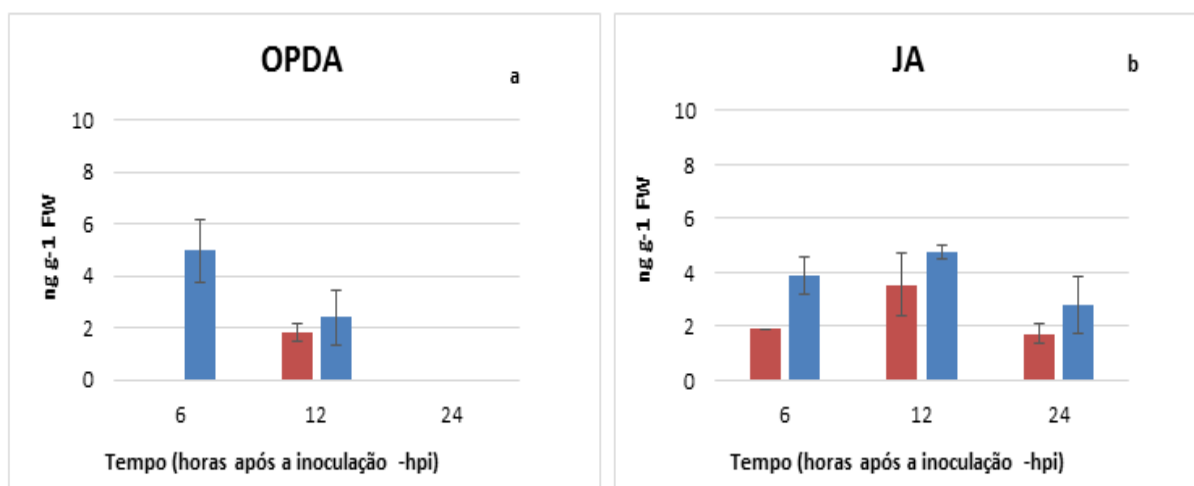


Figura 6 – Perfil de expressão de enzimas envolvidas na sinalização do JA por qPCR, *Jasmonate ZIM domain protein 1 - JAZ1* (a), *Jasmonate ZIM domain protein 3 - JAZ3* (b), *Basic helix-loop-helix Leu zipper transcription factor - MYC2* (c), *Novel interaction of JAZ/TIFY –NINJA* (d), *TOPELESS –TPL* (e), *pathogenesis related gene 10 -PR10* (f), enzimas envolvidas na sinalização por SA, *pathogenesis related gene 1- PR1* (g), *Nonexpresser genes PR1 -NPR1* (h), enzimas envolvidas no controlo das duas vias de sinalização, *WRKY DNA-Binding protein 70 -WRKY70* (i), *MYB domain protein 44 -AtMYB44* (j). Os resultados correspondem à média e desvio padrão de três réplicas biológicas. O *Fold change* revela a comparação da expressão do gene entre as amostras inoculadas com *P. viticola* e as amostras de controlo para cultivar ‘Regent’ às 6, 12 e 24 horas após inoculação (hpi). O * indica as diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$).

4.6 Quantificação dos níveis endógenos de OPDA, JA, JA-Ile e SA

Os níveis de OPDA, JA, JA-Ile e SA foram quantificados na cultivar ‘Regent’ nas primeiras horas de interação com o fungo *P. viticola*. Os nossos resultados mostram que os níveis de JA, JA-Ile e SA aumentaram entre as 6hpi e as 12hpi em relação ao controlo (figura 7 b, c, d; tabela 3 em anexo III). Desta maneira, não foi observado o antagonismo entre o SA e o JA como descrito na bibliografia para outros sistemas de interação planta – patógeno (Spoel et al. 2003; Beckers and Spoel, 2005; Glazebrook, 2005; Adie et al. 2007; Spoel et al. 2007; Santino et al. 2013), mas sim, uma cooperação entre as hormonas, estando de acordo com o descrito por Santino et al. (2013). Em videira, o SA e o JA poderão estar a atuar simultaneamente na sinalização contra o *P. viticola* nas primeiras horas de interação com a planta.

O OPDA pode funcionar como precursor do JA ou estar envolvido na sinalização. Os nossos resultados sugerem que o OPDA está a comportar-se como precursor do JA, porque os níveis de OPDA diminuem quando os níveis de JA e JA-Ile aumentam (figura 7 a, b, c). Assim, os nossos resultados suportam a hipótese que o JA tem um papel preponderante em estabelecer ou manter a resistência da cultivar ‘Regent’ contra *P.viticola*, tal é verificado pela regulação dos genes envolvidos na biossíntese do JA (Figueiredo et al. 2015), na sinalização por JA (descrito neste trabalho) e pelo aumento significativo dos níveis de JA-Ile às 12hpi, estando em conformidade com Polessani et al. (2010).



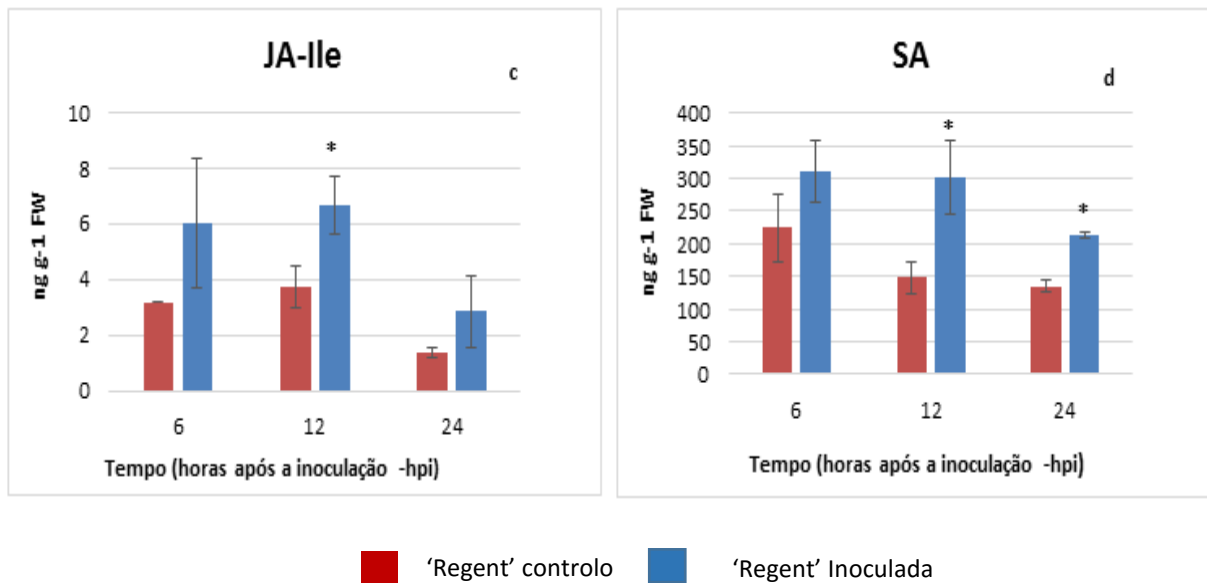


Figura 7 - Representação gráfica da comparação dos níveis endógenos (expressos em ng g⁻¹ FW) de *Cis*-(+)-12-*oxo-phytodienoic* - OPDA (a), ácido jasmónico - JA (b), ácido jasmónico ligado à isoleucina - JA-Ile (c), ácido salicílico - SA (d) entre as amostras inoculadas com *P.viticola* e o controle na cultivar 'Regent' às 6, 12 e 24 horas após inoculação (hpi). Os valores apresentados são médias de três réplicas biológicas, as barras negras correspondem ao desvio padrão e o * indica as diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0.05$).

5. Conclusão

No nosso estudo comparámos dois genótipos de videira após a inoculação com fungo biotrófico obrigatório *P. viticola*, a cultivar ‘Trincadeira’ (susceptível) e a cultivar ‘Regent’ (resistente). Em ambas as cultivares houve um *burst* de ROS e uma peroxidação lípidica após a inoculação com o fungo *P. viticola*. A cultivar ‘Regent’ apresentou um aumento mais acentuado de ROS muito cedo na interacção com fungo, ao contrário da cultivar ‘Trincadeira’ em que o aumento de ROS foi mais tardio e menos acentuado. Esta produção de ROS no genótipo resistente pode estar associada ao bloqueio da penetração do fungo, levando à ativação da morte celular programada no local da infeção e ativação de vias de sinalização (Kortekamp and Zyprian, 2003), obtendo uma resposta mais eficaz contra o patógeno do que a cultivar suscetível. Também foi descrito anteriormente que a cultivar ‘Regent’ apresenta um alto teor de compostos fenólicos após a inoculação de *P. viticola* (Ali et al. 2012). Os compostos fenólicos podem atuar como eliminadores de radicais livres protegendo as células da sua toxicidade oxidativa, das perturbações que podem causar na membrana celular (Ali et al. 2012). A presença destes compostos fenólicos e o aumento verificado na capacidade antioxidante da cultivar ‘Regent’ parece ser suficiente para evitar danos por ROS permitindo, no entanto, a manutenção de níveis de ROS suficientes para iniciar processos de sinalização. Por isso, na ‘Regent’ parece existir um balanço rigoroso entre o controlo de ROS e a sinalização. Para além disso, o ácido α -linolénico (C18:3) foi o principal ácido gordo presente na composição dos lípidos das membranas celulares na cultivar ‘Regent’ em resposta à inoculação com fungo, que correlabora com trabalho de Ali et al. 2012. Este ácido gordo é um precursor para a via de biossíntese do JA, sugerindo que o JA pode estar envolvido na defesa contra o fungo biotrófico *P. viticola*.

O aumento de expressão dos genes envolvidos na biossíntese do JA (Figueiredo et al. 2015), do controlo da sinalização por JA (apresentados neste trabalho) e ainda, o aumento significativo dos níveis endógenos de JA-Ile suportam a hipótese que o JA pode ser responsável por estabelecer ou manter a resistência da cultivar ‘Regent’ contra *P. viticola*. Os nossos resultados também mostram um aumento de expressão de genes envolvidos na via de sinalização por SA e um aumento dos níveis endógenos do SA, sugerindo que poderá haver uma cooperação entre o SA e o JA no início da interação da videira com o fungo *P. viticola* (figura 8).

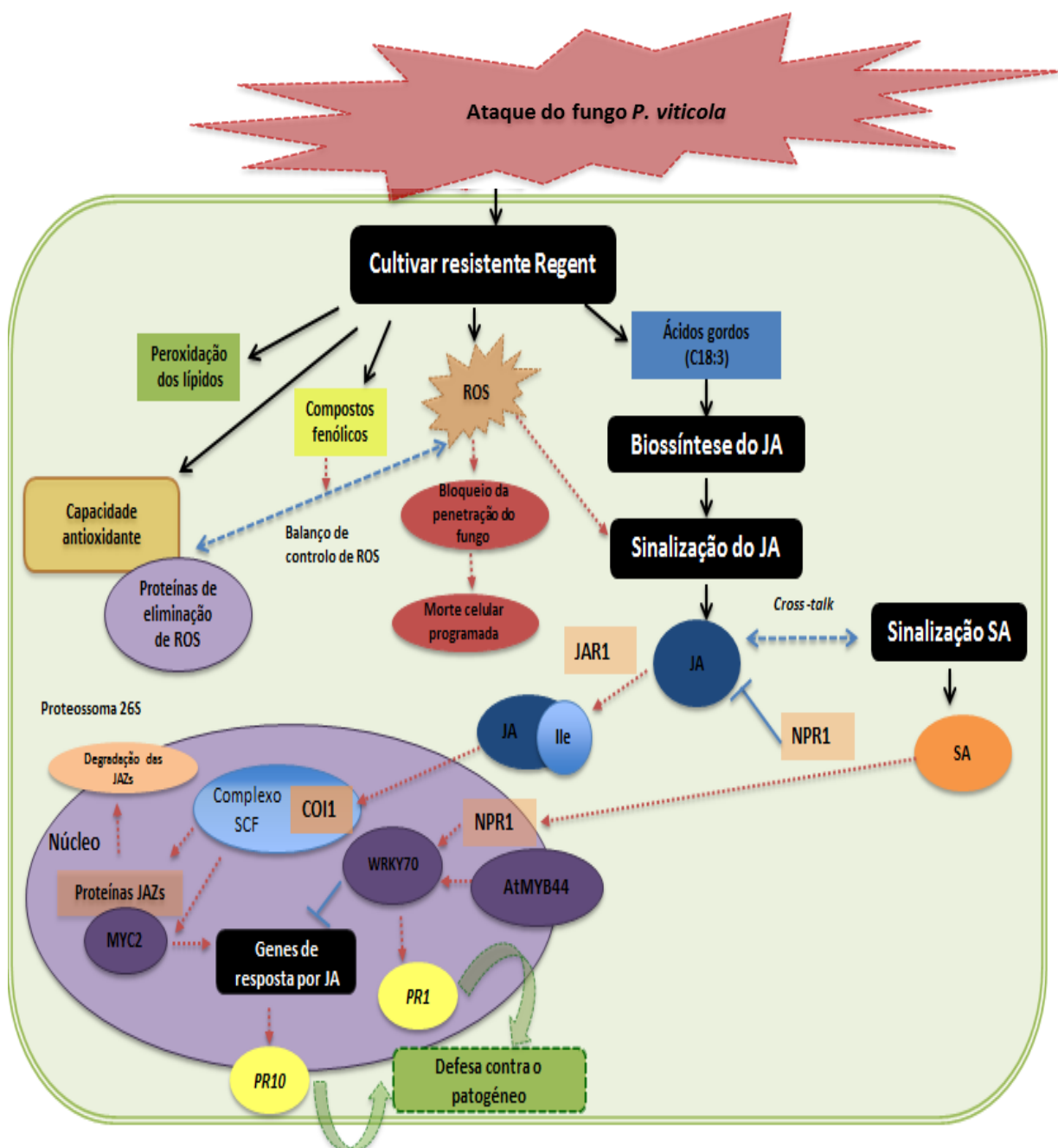


Figura 8 - Representação do processo de sinalização na cultivar resistente 'Regent' (aumento de ROS e da peroxidação lipídica), acompanhada pela biossintese do ácido jasmônico e da sua forma bioativa a partir do ácido α -linolénico (C18:3), da sinalização por JA e SA. AtMYB44, MYB domain protein 44; COI1, coronatine insensitive 1; complexo SCF, complexo Skp1-Cullin1-F-box protein; JA, ácido jasmônico; JA-Ile, ácido jasmônico ligado à isoleucina; JAR1, jasmonate-amido synthetase; JAZs, Jasmonate ZIM domain proteins; MYC2, basic helix-loop-helix Leu zipper transcription factor; NPR1, Nonexpresser genes PR1; PR1, pathogenesis related gene 1; PR10, pathogenesis related gene 10; ROS, espécies reativas de oxigênio; SA, ácido salicílico; WRKY70, WRKY DNA-Binding protein 70.

6. Referências Bibliográficas

- Adie, B., Pérez-Pérez, J., Pérez-Pérez, M., Godoy, M., Sánchez-Serrano, J.-J., Schmelz, E. and Solano, R. (2007). ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of defenses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19, 1665-1681.
- Ali, K., Maltese, F., Figueiredo, A., Rex, M., Fortes, A., Zyprian, E., Pais, M., Verpoorte, R. and Choi, Y. (2012). Alterations in grapevine leaf metabolism upon inoculation with *Plasmopara viticola* in different time-points. *Plant Science*, 191, 100-107.
- Antico, C., Colon, C., Banks, T. and Ramonell, K. (2012). Insights into the role of jasmonic acid-mediated defenses against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. *Frontiers in Biology*, 7, 48-56.
- Balbi, V. and Devoto, A. (2007). Jasmonate signalling network in Arabidopsis thaliana: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*, 177, 301-318.
- Ballaré, C. (2010). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Science*, 16.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M. and Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of Arabidopsis thaliana. *Lipids*, 44, 85-95.
- Bari, R. and Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69, 473-488.
- Beckers, J. and Spoel, S. (2005). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, 8, 1-10.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscalt, J., Corio-Costet, M. and Merillon, J. (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9119-9125.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S. and Merillon, J. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 493-499.
- Blum, M., Waldner, M. and Gisi, U. (2010). A single point mutation in the novel *PvCesA3* gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genetics Biology*, 47, 499-510.
- Breusegem, F. and Dat, J. (2006). Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. *Plant Physiology*, 141, 384-390.
- Brossa, R., Pintó - Marijuan, M., Francisco, R., López-Carbonell, M., Chaves, M. and Alegre, L. (2014). Redox proteomics and physiological responses in *Cistus albidus* shrubs subjected to long-term summer drought followed by recovery. *Planta*.
- Casagrande, K., Falginella, L., Castellarin, S., Testolin, R., and Gaspero, G. (2011). Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. *Planta*, 1097-1109.
- Chen, W.-J., Delmotte, F., Richart-Cervera, S., Douence, L., Greif, C., and Corio-Costet, M.-F. (2007). At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5162-5172.

- Chen, X., Wang, X., Zhang, Z., Wang, Y. and Zheng, X. (2008). Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73, 16-24.
- Chico, J., Chini, A., Fonseca, S. and Solano, R. (2008). JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Plant Biology*, 11, 486-494.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J., Fernandez- Calvo, P. and Solano, R. (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *Plant Journal*, 59, 77-87.
- Chung, H., Koo, A., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. and Howe, G. (2008). Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-DOMAIN genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, 146, 952-964.
- Creelman, R. and Mulpuri, R. (2002). The oxylipin pathway in Arabidopsis. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Dave, A. and Graham, I. (2012). Oxylipin signalling: a distinct role for the jasmonic acid precursor cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid (cis-OPDA). *Frontiers in Plant Science*, 3, 42.
- Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H.-H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., Rouxel, M. and Delière, L. (2013). Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, 27, 500-508.
- Demianski, A., Chung, K. and Kunkel, B. (2012). Analysis of Arabidopsis JAZ gene expression during *Pseudomonas syringae* pathogenesis. *Molecular Plant pathology*, 13, 46-57.
- Díez-Navajas, A., Wiedemann-Merdinoglu, S., Greif, C. and Merdinoglu, D. (2008). Nonhost Versus Host Resistance to the Grapevine Downy Mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the Tissue Level. *Phytopathology*, 98, 776-780.
- Dodd, A., Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., Nagy, F., Hibberd, J., Millar, A. and Webb, A. (2005). Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. *Science*, 309, 630-633 .
- Figueiredo, A., Martins, J., Sebastiana, M., Guerreiro, A., Silva, A. et al. (2015). Early events on compatible and incompatible grapevine interaction with *Plasmopara viticola*: a proteomic perspective of cultivar specific behaviour. (Resultados não publicados).
- Figueiredo, A., Monteiro, F. and Sebastiana, M. (2015). First clues on a jasmonic acid role in grapevine resistance against the biotrophic fungus *Plasmopara viticola*. *European Journal of Plant Pathology*.
- Figueiredo, A., Monteiro, F., Fortes, A., Rex, M., Zyprian, E., Sousa, L., and Salomé, M. (2012) Cultivar specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine. *Functional & Integrative Genomics*, 12, 379-386.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C. and Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5, 344-350.
- Fuentes, M., Segura, R., Abian, O., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J. (2004). Determination of protein-protein interactions through aldehyde-dextran intermolecular cross-linking. *Proteomics*, 4, 2602-2607.
- Galet P. (1977). Les maladies et les parasites de la vigne, vol I. Imp. Paysan du Midi, Montpellier.

- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., et al. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interact*, 19, 711-724.
- Gessler, C., Pertot, I., and Perazzolli, M. (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 3-44.
- Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavi, S., Rudaz, S., Wolfender, J. and Farmer, E. (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 34506-34513.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Phytopathology*, 43, 205-27.
- Global Agricultural Information Network, 2013.
- Göbel, C., Feussners, I. and Rosahl, S. (2003). Lipid Peroxidation during the Hypersensitive Response in Potato in the Absence of 9-Lipoxygenases. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 52834-52840.
- Gomès, E., Jakobsen, M., Axelsen, K., Geisler, M. and Palmgren, M. (2000). Chilling Tolerance in Arabidopsis Involves ALA1, a Member of a New Family of Putative Aminophospholipid Translocases. *The Plant Cell*, 12, 2441- 2453.
- Hamiduzzaman, M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J. and Mauch-Mani, B. (2005). Beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 819-829.
- Hammond-Kosack, K. and Jones, J. (1996). Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell*, 8, 1773-1791.
- Hashimoto, M., Kisseleva, L., Sawa, S., Furukawa, T., Komatsu, S. and Koshiba, T. (2004). A Novel Rice PR10 Protein, RSOsPR10, Specifically Induced in Roots by Biotic and Abiotic Stresses, Possibly via the Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Plant Cell Physiology*, 45, 550-559.
- He, Y., Chung, E., Hubert, D., Tornero, P. and Dangl, J. (2012). Specific Missense Alleles of the Arabidopsis Jasmonic Acid Co-Receptor COI1 Regulate Innate Immune Receptor accumulation and Function. *PLOS Genetics*, 8.
- Health, M. (2000). Hypersensitive response – related death. *Plant Molecular Biology*, 44, 321-334.
- Hellemans, J., Mortier, G., Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8.
- Hodges, D., DeLong, J., Forney, C. and Prange, R. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.
- Hotta, C., Gardner, M., Hubbard, K., Baek, S., Dalchau, N., Suhita, D., Dodd, A. and Webb, A. (2007). Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant, Cell & Environment*, 30, 333-349.
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H., Yu, J., Nam, S., Ko, J., Park, J., Seo, Y., Kim, E., Ryu, S., Kim, W., Lee, Y., Kang, H. and Lee, I. (2008) Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Developmental Cell*, 2, 183-192.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. and Okada, K. (2001). The defective in anther dehiscence gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid

biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13, 2191-2209.

Jones, J. and Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.

Juerges G., Kassemeyer H-H, Du'rrenberger M., Duggelin M., and Nick P. (2009). The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology*, 11 (6), 886-898.

Kachroo, A. and Kachroo, P. (2009). Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense. *Phytopathology*, 47,153-76.

Kazan, K. and Manners, J. (2013). MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant*, 2-18.

Kim, S., Yu, S., Kang, Y., Kim, S., Kim, J.-Y., Kim, S-H. and Kang, K. (2008). The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Reports*, 27, 593-603.

Kortekamp, A. (2006). Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 58-67.

Kortekamp, A. and Zyprian, E. (2003). Characterization of *Plasmopara*-Resistance in grapevine using *in vitro* plants. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1393-1400.

Kortekamp, A., Welter, L., Vogt, S., Knoll, A., Schwander, F., To'pfer, R. and Zyprian, E. (2008). Identification, isolation and characterization of a CC-NBS-LRR candidate disease resistance gene family in grapevine. *Molecular Breeding*, 22, 421-432.

Koussa, T., Dubos, B. and Cherrad, M. (2002). Les teneurs en acides gras, en eau et en acide abscissique des feuilles de vigne (*Vitis vinifera* L. var. Cabernet Sauvignon) infectées par *Eutypa lata*. *Journal of grapevine research*, 41.

Liu, J. and Ekramoddoullah, A. (2006). The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68, 3-13.

Liu, J., Ekramoddoullah, A. and Yu, X. (2004). Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening. *Physiologia Plantarum*, 119, 544-553.

Loon, V. and Strien, V. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 55, 85-97.

Los, D. and Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666, 142- 157.

Mandal, S., Das, R. and Mishra, S. (2011). Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 117-123.

Matos, A., Mendes, A., Scotti-Campos, S. and Arrabaça, J. (2009). Study of the effects of salicylic acid on soybean mitochondrial lipids and respiratory properties using the alternative oxidase as a stress-reporter protein. *Physiologia Plantarum*.

Mehdy, Mona C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiology*, 105, 467-472.

- Melan, M., Dong, X., Endara, M., Davis, K., Ausubel, F. and Peterman, T. (1993). An Arabidopsis thaliana lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 101, 441-450.
- Metcalfe, L. and Schimits, J. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 38, 510.
- Millardet A. (1881). Notes sur les vignes américaines et opuscules divers sur le même sujet. Bordeaux, France: Féret & Fils.
- Milli, A., Cecconi, D., Bortesi, L., Persi, A., Rinalducci, S., Zamboni, A., Zoccatelli, G., Lovato, A., Zolla, L. and Polverari, A. (2012). Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. *Journal of Proteomics*, 75, 1284-1302
- Monteiro, F., Sebastiana, M., Pais, M. and Figueiredo, A. (2013). Reference gene selection and validation for the early responses to downy mildew infection in susceptible and resistant *vitis vinifera* cultivars. *PLoS ONE*, 8, e72998.
- Noctor, G. and Foyer, C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Padham, A., Hopkins, M., Wang, T.-W., McNamara, L., Lo, M., Richardson, L., Smith, M., Taylor, C. and Thompson, J. (2007). Characterization of a Plastid Triacylglycerol Lipase from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143, 1372-1384.
- Pauwels, L., Barbero, G., Geerinck, J., Tillemans, S., Grunewald, W., Pérez, A., Chico, M., Bossche, R., Sewell, J., Gil, E., García-Casado, G., Witters, E., Inzé, D., Long, J., Jaeger, G., Solano, R. and Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate Signalling. *Nature*, 464, 788-791.
- Peña-Cortés, H., Barrios, P., Dorta, F., Polanco, V., Sánchez, C., Sánchez, E. and Ramírez, I. (2005). Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23, 246-260.
- Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D., and Mestre, P. (2010). Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology*, 10.
- Pieterse, C., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. and Wees, S. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Cell and Developmental Biology*, 28, 489-521.
- Polesani M., Bortesi L., Ferrarini A., Zamboni A., Fasoli M., Zadra C., Lovato A., Pezzotti M., Delledonne M., and Polverari A. (2010). General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics*, 11, 117-13.
- Santino, A., Taurino, M., Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V. and Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses. *Plant Cell Reports*, 32, 1085-1098.
- Schommer, C., Palatnik, J., Aggarwal, P., Chetelat, A., Cubas, P., Farmer, E., Nath, U. and Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *Plos Biology*, 6, 1991-2001.
- Sgobba, A., Paradiso, A., Dipierro, S., Garab, L. and Concetta de Pinto, M. (2015). Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short- and long-term heat stress. *Physiologia Plantarum*, 153, 68-78.

- Sharma, P., Jha, A., Dubey, R. and Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 26.
- Shim, J., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y-W., Choi, Y., Lee, J., Song, J., Kim, J-K. and Choi, Y. (2013). AtMYB44 regulates WRKY70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *The Plant Journal*, 73, 483-495.
- Spoel, S., Koornneef, A., Claessens, S., Korzelius, J., Pelt, J., Mueller, M., Buchala, A., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Loon, L., Dong, X. and Pieterse, C. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell*, 15, 760-770.
- Spoel, S., Johnson, J. and Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of sciences (PNAS)*, 104, 18842-18847.
- Staswick, P. and Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16, 2117-2127.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S., Howe, G. and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448, 661-665.
- Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. and Lebeda, A. (2006). Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68, 22-32.
- Trouvelot, S., Varnier, A., Allegre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J., Pugin, A., and Daire, X. (2008). A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 232-243.
- Upchurch, R. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30, 967-977.
- Vick, B. and Zimmerman, D. (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 111, 470-477.
- Walley, J., Kliebenstein, D., Bostock, R. and Dehesh, K. (2013). *Plant Biology*, 16, 520-526.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100, 681-697.
- Wasternack, C. and Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 111, 1021-1058.
- Yang, Y., Shah, J. and Klessig, D. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development*, 11, 1621-1639.

7. Anexos

Anexo I - Sequências dos *primers* dos genes alvo e dos genes de referência

Tabela 1- Representação das sequências dos *primers* para análise qPCR dos genes alvo e dos genes de referência. Estão representados o tamanho do amplicão (bp), a eficiência de amplificação, a temperatura de *annealing* (Ta) e a temperatura de *melting* (Tm).

Sequência alvo (Número de acesso)*	Sequência do Primer (5'-3')	Tamanho (bp)	Eficiência de Amplificação	Ta (°C)	Tm (°C)
Genes de Referência (Monteiro et al. 2013; Figueiredo et al. 2015)					
<i>EF1α</i> (EC959059)	F: GAACTGGGTGCTTGATAGGC R: ACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA	164	1,91	60	79,16
<i>GADPH</i> (EF192466)	F: TCAAGGTCAAGGACTCTAACACC R: CCAACAACGAACATAGGAGCA	226	1,99	60	80,95
<i>UBQ</i> (EC922622)	F: GAGGGTCGTCAGGATTTGGA R: GCCCTGCACTTACCATCTTTAAG	75	1,95	60	78,86
Genes associados à sinalização por JA					
<i>JAZ 1</i> (XM_002272327.3)	F: CAACCCAAAGCTCAACAAAG R: TAAGTGGGAGTGGACAAGAT	120	1,98	60	76,45
<i>JAZ 3</i> (XM_002282652.2)	F: TCCCTCCTGTAAGTCCCAAT R: TCCCATAAAACCATCACCT	89	1,91	60	77,5
<i>MYC2</i> (XM_002280217.2)	F: ATGCATTGCGAGCTGTTGTG R: TCTGCCTCGGTGTTAGTTTC	177	1,90	60	79,90
<i>NINJA</i> (XM_002283943.2)	F: AAATTCGGGGGATCTGGTTC R: TGGATTGGCATGCTCTTCAC	188	2,00	60	76,18
<i>TOPLESS</i> (XM_002268229.1)	F: TCGGGATGGATGATTCTACA R: GGCAAGGCCAGTTATTCTC	97	1,94	60	75,89
<i>PR10</i> (HS075818')	F: GTTTTGA CTGACGGCGTTGA R: TGGTGTGGTACTTGCTGGTGTT	99	1,903	62	79,99
Genes associados à sinalização por SA					
<i>NPR1</i> (XM_002281439.2)	F: ATGGATGCCGATGACTTA R: TCCTTGTA CCTCCTTCTT	85	2,00	60	78,42
<i>PR1</i> (XM_002273752.2)	F: AAAAATGGGGTTGTGTAGGAG R: TGTGTGAGCATTGAGGTAGT	112	1,93	60	79,20
Genes associados ao controle da relação entre as vias do SA e JA					
<i>WRKY70</i> (XM_002275365.2)	F: GCCACCATACTGCAGAGAT R: CAGACCCAACCATATTATTAG	89	2,02	60	77,97

AtMYB44 (XM_002284979.2)	F: CAACGGTTTCGGGTCATAAT R: GTTCTCGGCACTGGTCTAT	111	1,93	60	79,5
-----------------------------	---	-----	------	----	------

Anexo II - Composição dos FAs nas membranas celulares na interação da videira com *P.viticola*

Tabela 2 – Representação das proporções (expresso em %) dos diferentes ácidos gordos (FAs) ± desvio padrão, índice das duplas ligações (DBI) ± desvio padrão, os rácios dos FAs saturados, os rácios dos FAs saturados com os FAs insaturados e os rácios dos FAs insaturados nas amostras inoculadas com *P. viticola* e no controlo das cultivares ‘Regent’ e ‘Trincadeira’ às 6, 12 e 24 horas após inoculação (hpi). Os valores apresentados correspondem à média de quatro réplicas técnicas e o * indica as diferenças estatisticamente significativas (p≤0.05).

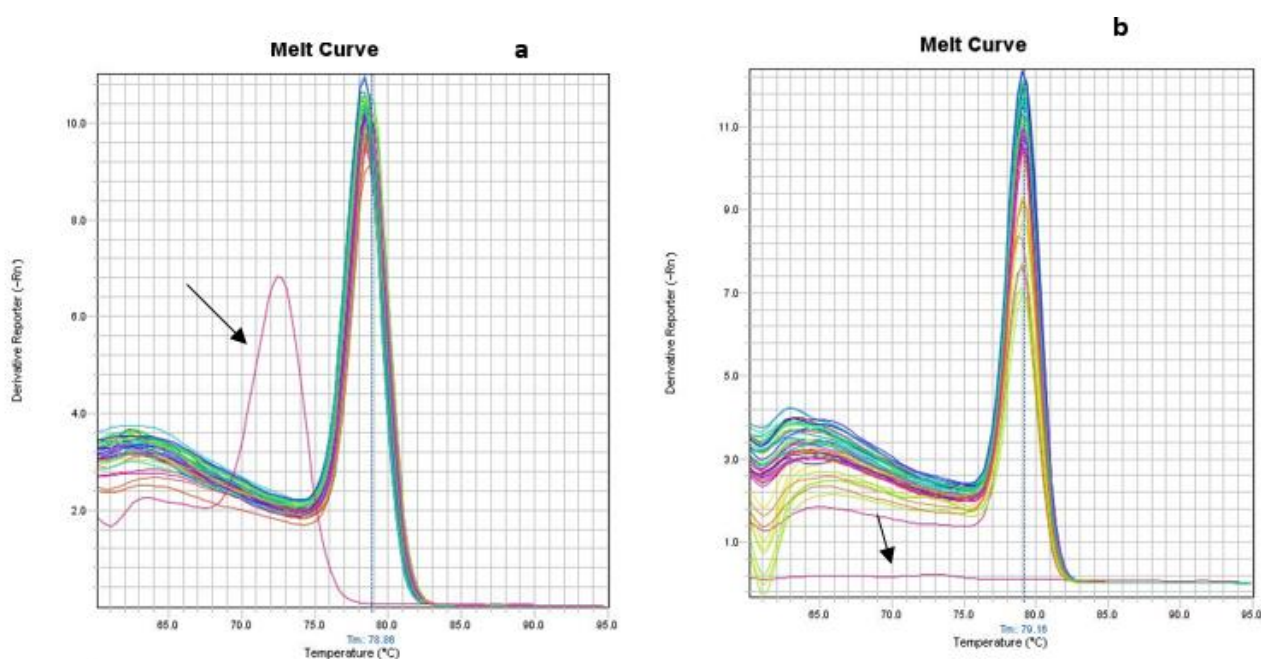
Proporções (%)	Regent						Trincadeira					
	Controlo			Inoculada			Controlo			Inoculada		
	6hpi	12hpi	24hpi	6hpi	12hpi	24hpi	6hpi	12hpi	24hpi	6hpi	12hpi	24hpi
C16:0	23,39 ± 1,22	21,38 ± 1,41	20,92 ± 4,43	18,41* ± 0,30	19,10* ± 0,66	18,95 ± 0,93	16,03 ± 0,89	16,97 ± 1,40	17,83 ± 2,25	16,81 ± 0,35	16,71 ± 0,84	17,98 ± 0,68
C16:1t	2,34 ± 0,47	2,71 ± 0,14	2,59 ± 0,33	2,99* ± 0,24	3,00 ± 0,32	2,80 ± 0,30	3,05 ± 0,16	3,10 ± 0,34	3,11 ± 0,50	2,89 ± 0,28	3,07 ± 0,15	2,96 ± 0,08
C18:0	7,74 ± 1,80	4,15 ± 0,63	3,05 ± 0,60	4,34 ± 0,85	4,52 ± 0,86	2,61 ± 0,57	1,75 ± 0,55	2,08 ± 0,55	1,91 ± 0,64	1,95 ± 0,63	1,88 ± 0,23	2,22 ± 1,40
C18:1	3,49 ± 0,16	5,49 ± 0,15	4,04 ± 0,43	4,24* ± 0,14	4,42* ± 0,04	3,62 ± 0,19	3,23 ± 0,47	3,22 ± 0,48	3,47 ± 0,28	3,70* ± 0,21	3,16 ± 0,14	4,00* ± 0,17
C18:2	13,69 ± 0,51	12,72 ± 0,79	16,40 ± 0,84	14,12 ± 0,67	13,51* ± 0,90	15,88 ± 0,26	13,69 ± 0,55	13,98 ± 0,95	14,55 ± 0,91	14,08 ± 0,84	14,81 ± 0,33	14,93 ± 0,42
C18:3	50,33 ± 0,40	48,91 ± 1,65	53,00 ± 3,63	55,90* ± 1,06	55,46* ± 1,05	56,15 ± 1,39	62,26 ± 2,37	60,66 ± 1,15	59,13 ± 2,09	60,59 ± 1,30	60,38 ± 1,06	57,90 ± 1,78
DBI	3,65 ± 0,04	3,79 ± 0,11	3,97 ± 0,25	4,06* ± 0,04	4,02* ± 0,06	4,13 ± 0,08	4,41 ± 0,11	4,33 ± 0,09	4,26 ± 0,16	4,33 ± 0,05	4,34 ± 0,07	4,21 ± 0,12
Racões (FA saturados)												
C16:0/C18:0	3,02	5,15	6,86	4,24	4,23	7,27	9,15	8,16	9,33	8,63	8,88	8,09
Racões (FA saturados/FA insat.)												
C16:0/C16:1t	10,00	7,90	8,07	6,16	6,37	6,77	5,26	5,47	5,74	5,83	5,45	6,07
C18:0/C18:1	2,21	0,76	0,75	1,02	1,02	0,72	0,54	0,65	0,55	0,53	0,60	0,55
C18:0/C18:2	0,61	0,24	0,19	0,31	0,33	0,16	0,13	0,15	0,13	0,14	0,13	0,15
C18:0/C18:3	0,15	0,09	0,06	0,08	0,08	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
Racões (FA insat.)												
C18:1/C18:2	0,27	0,32	0,25	0,30	0,33	0,23	0,24	0,23	0,24	0,26	0,21	0,27
C18:2/C18:3	0,25	0,36	0,31	0,25	0,24	0,28	0,22	0,23	0,25	0,23	0,25	0,26

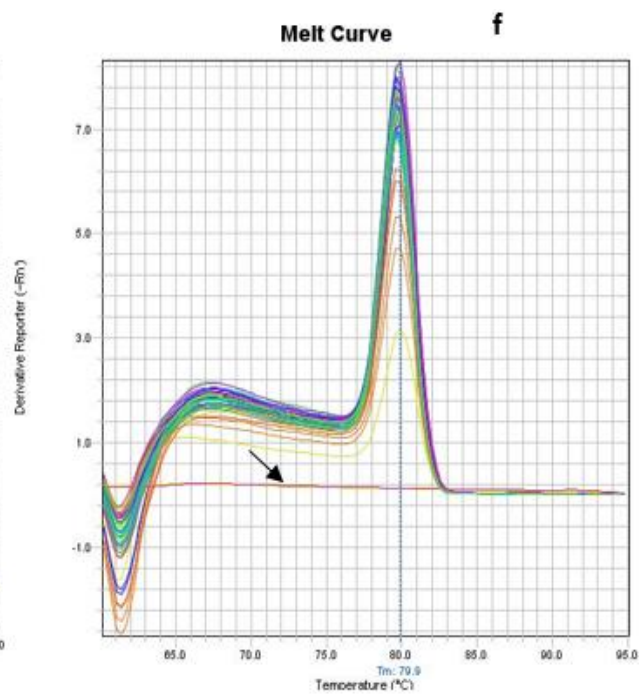
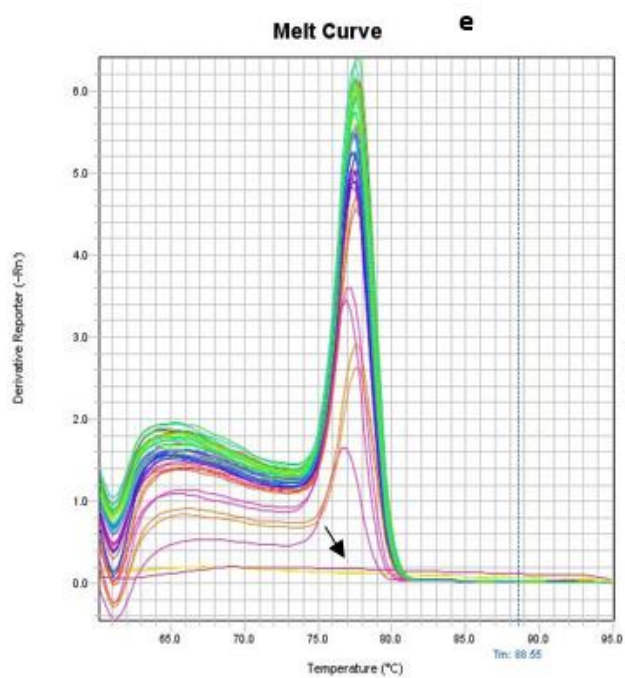
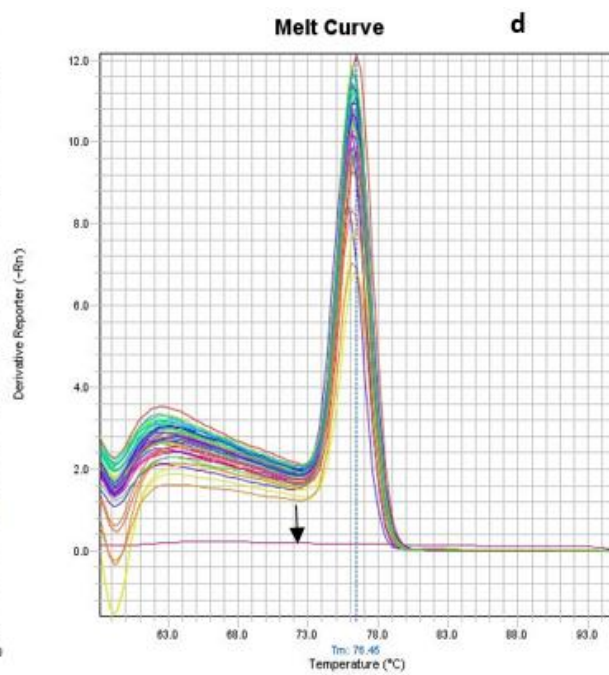
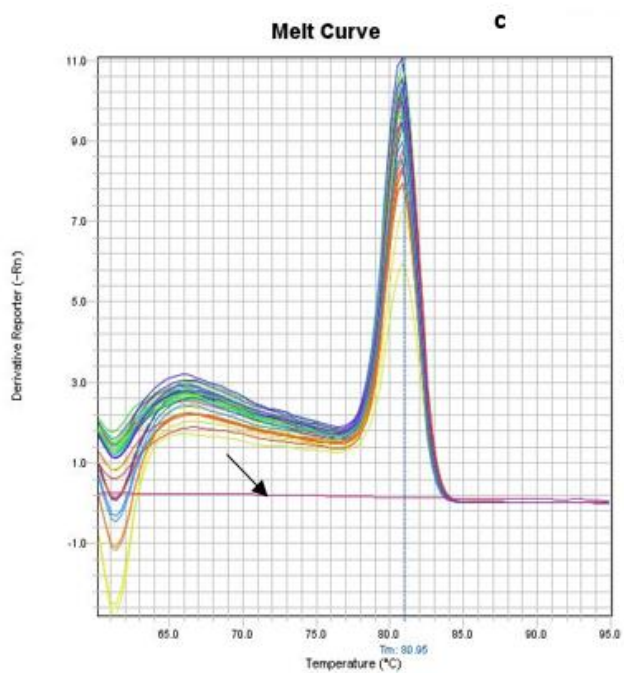
Anexo III – Quantificação de fitohormonas (OPDA, JA, JA-Ile e SA) na cultivar ‘Regent’

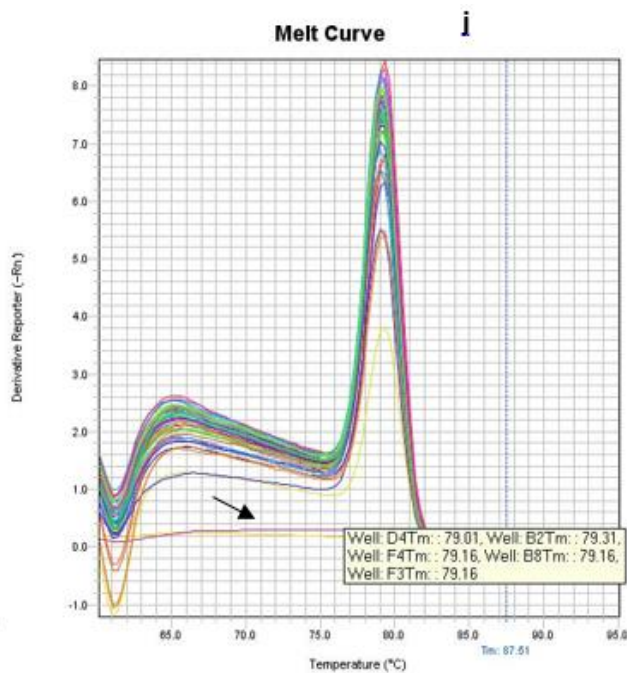
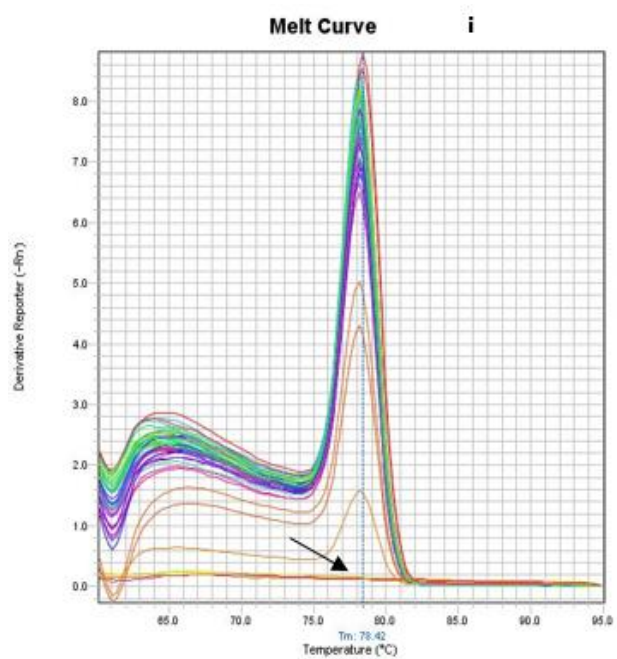
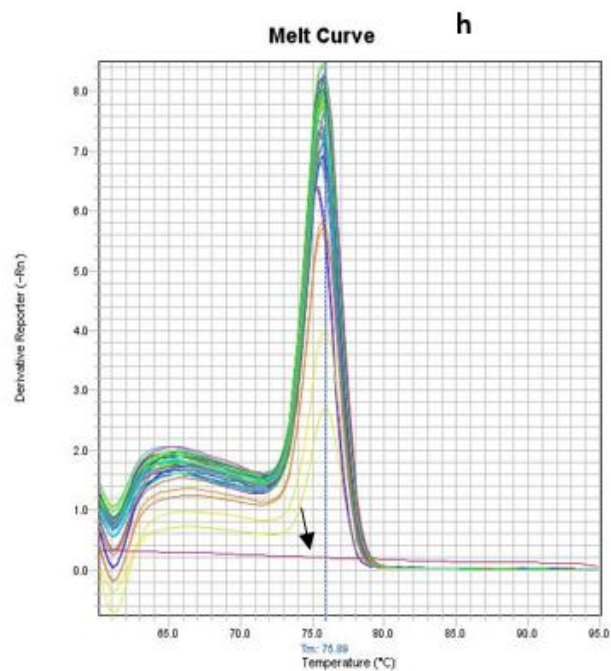
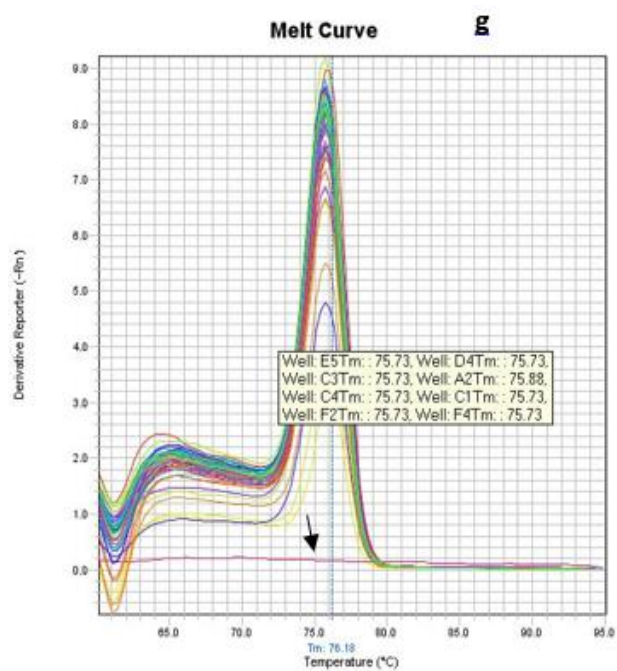
Tabela 3- Representação dos níveis endógenos das fitohormonas, *cis* –(+)- 12 - *oxo-phytodienoic* (OPDA), ácido jasmónico (JA), ácido jasmónico ligado à isoleucina (JA-Ile) e o ácido salicílico (SA) (expressos em ng g⁻¹ FW) nas amostras inoculadas com fungo *P. viticola* e no controlo da cultivar ‘Regent’ às 6, 12 e 24 horas após a inoculação (hpi). Os valores apresentados são médias de três réplicas biológicas com os respetivos desvios padrões e o * indica as diferenças estatisticamente significativas (p≤0.05).

Fitohormonas (ng g ⁻¹ FW)	'Regent'					
	Controlo			Inoculada		
	6hpi	12hpi	24hpi	6hpi	12hpi	24hpi
OPDA	0	1,80 ± 0,35	0	4,97 ± 1,19	2,40 ± 1,08	0
JA	1,9 ± 0	3,53 ± 1,17	1,7 ± 0,36	3,87 ± 0,67	4,73 ± 0,25	2,8 ± 1,04
JA-Ile	3,2 ± 0	3,73 ± 0,75	1,4 ± 0,2	6,05 ± 2,33	6,7* ± 1,05	2,87 ± 1,29
SA	223,80 ± 52,61	147,67 ± 23,60	134,53 ± 9,49	310,63 ± 47,38	301,67* ± 55,44	213,37* ± 5,80

Anexo IV – Curvas de dissociação dos genes estudados







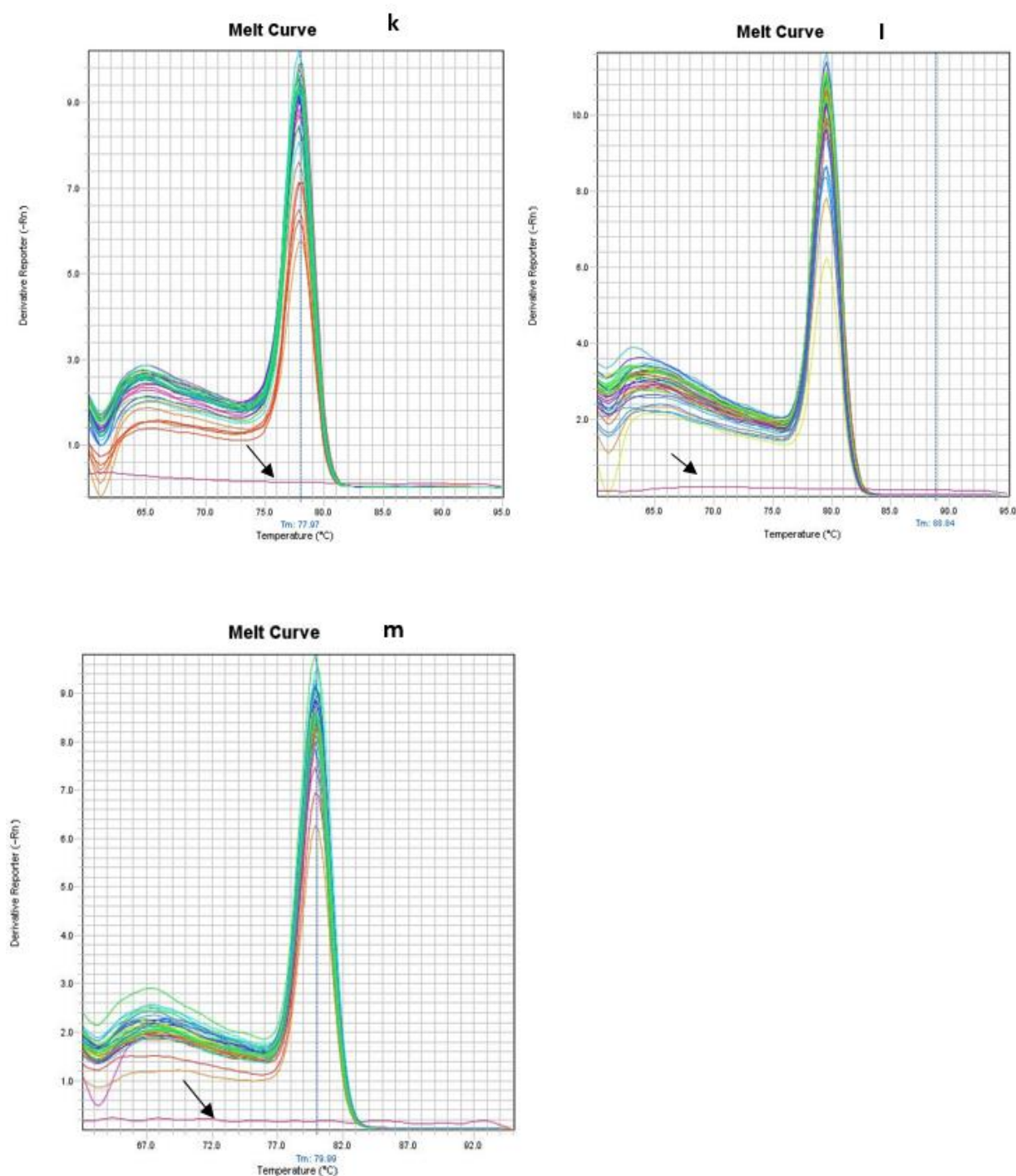


Figura 9 – Curvas de dissociação dos genes estudados recolhidas a partir do software *StepOne™* version 2.2.2 (Applied Biosystems). Genes de referência: *UBQ*, *Poly -Ubiquitin* (a), *EF1α*, *Elongation factor 1α* (b), *GAPDH*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (c); Genes de estudo: *JAZ1*, *Jasmonate ZIM domain protein 1* (d), *JAZ3*, *Jasmonate ZIM domain protein 3* (e), *MYC2*, *basic helix-loop-helix Leu zipper transcription factor* (f), *NINJA*, *Novel interaction of JAZ/TIFY* (g), *TPL*, *TOPELESS* (h), *NPR1*, *Nonexpresser genes PR1* (i), *PR1*, *pathogenesis related gene 1* (j), *WRKY70*, *WRKY DNA-Binding protein 70* (k), *AtMYB44*, *MYB domain protein 44* (l) e *PR10*, *pathogenesis related gene 10* (m). Controle non-template é indicado por uma seta preta.